

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Medicina de Lisboa**



**Avaliação das alterações do perfil proteico salivar em  
indivíduos com obesidade mórbida nas fases pré- e pós  
cirurgia bariátrica**

Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy

**Mestrado em Doenças Metabólicas e Comportamento  
Alimentar**

**2013**



**A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de Conselho Científico de 17 de Setembro de 2013**



**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Medicina de Lisboa**



**Avaliação das alterações do perfil proteico salivar em  
indivíduos com obesidade mórbida nas fases pré- e pós  
cirurgia bariátrica**

Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy

**Mestrado em Doenças Metabólicas e Comportamento  
Alimentar**

Dissertação orientada pela Professora Doutora Isabel do Carmo e co-orientada pela Professora Doutora Célia Antunes

**Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.**



## **Agradecimentos**

Agradeço à Professora Doutora Isabel do Carmo e à Professora Doutora Célia Antunes, pela orientação do trabalho.

Agradeço à minha família, em particular ao meu marido, pelo incentivo e apoio. Um agradecimento muito especial à minha filhota, Maria Rita, que tendo nascido durante o período de realização desta tese, foi privada de alguns momentos de mimos e brincadeiras para realização da mesma.





## Resumo

A obesidade representa um problema de saúde pública, associado a elevadas taxas de morbilidade com custos pessoais e económicos. Em muitos casos, a obesidade está associada à escolha de alimentos calóricos e palatáveis, existindo estudos que sugerem alterações na sensibilidade gustativa em obesos. Tendo a saliva uma participação na avaliação sensorial dos alimentos, alterações na sua composição podem modular a percepção dos alimentos. Por outro lado, este fluido apresenta potencial como fonte de biomarcadores de estados fisiológicos, mas a sua composição tem sido pouco estudada em obesos. No presente estudo comparou-se a composição proteica da saliva entre mulheres normoponderais e obesas submetidas (OCC) e não submetidas (OSC) a cirurgia bariátrica. Através da análise dos perfis SDS-PAGE observou-se um decréscimo de expressão da banda de 56,8 kDa, para mulheres OCC, tendo sido a mesma identificada como alfa-amilase por Western Blot. Já a actividade enzimática desta proteína observou-se estar aumentada em mulheres OSC. Nos perfis electroforéticos bi-dimensionais foram também observadas diminuições na expressão de 2 spots identificados como amilase nas mulheres OCC. Por outro lado mulheres OCC e OSC diferiram entre si em relação à expressão de isoformas diferentes desta proteína, sugerindo diferentes funcionalidades destas, as quais deverão ser exploradas no futuro. Os perfis 2D mostraram ainda aumentos na expressão da proteína zinco- $\alpha$ -2-glicoproteína em mulheres OSC e OCC, o que poderá ter a ver com o papel descrito desta proteína na lipólise. A nível da anidrase carbónica VI (CA VI), mulheres OCC apresentaram expressões mais baixas, estando os níveis de expressão desta proteína positivamente correlacionados com o Índice de Massa Corporal, em OCC e OSC. Tendo em conta a potencial relação da  $\alpha$ -amilase com a percepção do gosto doce e da

CA VI com a sensibilidade para o gosto amargo, é possível que a saliva esteja envolvida em alterações na percepção gustativa em indivíduos obesos.

**Palavras chave** –  $\alpha$ -Amilase, Anidrase carbónica VI; Cirurgia bariátrica; Obesidade, Proteoma salivar.

## Abstract

Obesity represents a public health problem associated with high morbidity, presenting enormous personal and economical costs. In many cases, obesity is associated with the choice of palatable and caloric foods, with studies suggesting changes in taste sensitivity in obese individuals. Since saliva has a role in sensory evaluation, changes in its composition can modulate food perception. Moreover, this fluid presents potential as a source of biomarkers of physiological states. Nonetheless, its composition in obesity has been few studied. In the present study we compared the protein composition of saliva between normal weight and obese women submitted (OCC) and not submitted (OSC) to bariatric surgery. Through analysis of SDS-PAGE profiles, it was observed a decrease in expression of the band with 56.8 kDa in OCC women. This band was identified as  $\alpha$ -amylase by Western blot. Concerning enzymatic activity, OSC women presented an increase comparatively to the other groups. In two-dimensional electrophoretic (2-DE) profiles decreases in expression of two spots in women identified as  $\alpha$ -amylase were also observed. On the other hand, OCC and OSC women differed from each other in relation to the isoforms of this protein differently expressed, suggesting possible different functions for each of these isoforms. These must be explored in the future. The 2-DE profiles also demonstrated increases in expression of the protein zinc- $\alpha$  2-glycoprotein for OSC and CCO women, which may be related to the known role of this protein in lipolysis. For carbonic anhydrase VI (CA VI) the expression levels were reduced in OCC women. Moreover, the expression levels of this protein were found to positively correlate with OCC and OSC women body mass index. Given the potential relationship of  $\alpha$ -amylase with sweet taste and CA VI with bitter taste sensitivities, it is possible that saliva is involved in changes in taste perception in obese individuals.

**Key words** –  $\alpha$ -Amylase, Bariatric surgery. Carbonic anhydrase VI, Obesity, Salivary proteome.

## Índice

1. Introdução -----	1
1.1. Obesidade: definição e caracterização -----	1
1.2. Regulação do comportamento de ingestão e desenvolvimento da obesidade -----	2
1.3. Importância da percepção dos alimentos no desenvolvimento da obesidade -----	5
1.4. Cirurgia bariátrica: características gerais e efeitos nas escolhas alimentares -----	9
1.5. Saliva -----	12
1.5.1. Papel da saliva na percepção e aceitação dos alimentos -----	15
1.5.2. Outras funções salivares potencialmente alteradas com a obesidade -----	17
2. Objectivos -----	21
3. Materiais e métodos -----	23
3.1. População e recolha das amostras de saliva -----	23
3.2. Preparação das amostras e determinação da concentração em proteína total -----	24
3.3. Perfil proteico SDS-PAGE -----	25
3.4. Electroforese bi-dimensional -----	26
3.5. Actividade enzimática da $\alpha$ -amilase salivar -----	30
3.6. Imunomarcção das proteínas $\alpha$ -amilase salivar e anidrase carbónica VI (Western Blot) -----	31
3.7. Tratamento estatístico dos resultados -----	33
4. Resultados -----	35
4.1. Características da população em estudo -----	35
4.2. Avaliação de variações na concentração em proteína total das amostras de saliva -----	37
4.3. Estudo de alterações no perfil proteico associadas à obesidade -----	38

4.4. Análise da expressão da proteína $\alpha$ -amilase salivar -----	45
4.5. Avaliação da actividade enzimática da $\alpha$ -amilase salivar -----	48
4.6. Análise da expressão da proteína anidrase carbónica VI -----	49
5. Discussão -----	53
6. Conclusões -----	63
7. Bibliografia -----	67
Anexos -----	81

## **Índice de figuras**

<b>Figura 1</b>	Mecanismos envolvidos na regulação da ingestão alimentar -----	3
<b>Figura 2</b>	Localização anatómica das glândulas salivares maiores -----	13
<b>Figura 3</b>	Representação esquemática do processo de secreção salivar -----	14
<b>Figura 4</b>	Índices de massa corporal dos 3 grupos em estudo -----	35
<b>Figura 5</b>	Concentração de proteína total das amostras de saliva mista -----	37
<b>Figura 6</b>	Imagem representativa dos perfis proteicos obtidos por separação electroforética uni-dimensional (SDS-PAGE) -----	38
<b>Figura 7</b>	Expressão das bandas observadas nos perfis proteicos uni- dimensionais -----	39
<b>Figura 8</b>	Imagens representativas dos perfis proteicos bi-dimensionais -----	42
<b>Figura 9</b>	Expressão das bandas marcadas com o anticorpo primário anti- $\alpha$ - amilase -----	47
<b>Figura 10</b>	Actividade enzimática da $\alpha$ -amilase -----	49
<b>Figura 11</b>	Expressão das bandas marcadas com o anticorpo primário anti- anidrase carbónica VI -----	51





## **Índice de tabelas**

<b>Tabela 1</b>	Classificação do IMC e riscos associados de acordo com a OMS --	2
<b>Tabela 2</b>	Características da amostra estudada -----	36
<b>Tabela 3</b>	Comparação da expressão de <i>spots</i> proteicos entre os 3 grupos experimentais -----	43
<b>Tabela 4</b>	Identificação das proteínas presentes em <i>spots</i> proteicos diferencialmente expressos entre grupos -----	44
<b>Tabela 5</b>	Análise individual das membranas obtidas por imunomarcação com o anticorpo primário anti- $\alpha$ -amilase -----	47



## **Lista de Abreviaturas**

**BSA** – Albumina do soro bovino

**CA VI** – Anidrase carbónica VI

**CHAPS** – Propanosulfonato de 3-(3-colamidopropil) dimetilamónio

**2-DE** – Electroforese bi-dimensional

**DTT** – Ditioneitol

**GLP-1** – Péptido 1 semelhante à glucagina

**IMC** – Índice de Massa Corporal

**NP** – Grupo de mulheres normoponderais

**OCC** – Grupo de mulheres obesas submetidas a cirurgia bariátrica

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**OSC** – Grupo de mulheres obesas não submetidas a cirurgia bariátrica

**PAGE** – Electroforese em gel de poliacrilamida

**PDVF** – Fluoreto de polivinilideno

**PROP** – 6-n-propil tiouracilo

**PRPs** – Proteínas ricas em prolina

**PTC** – Fenil-tiocarbamida

**PYY** – Péptido YY

**R<sub>f</sub>** – Mobilidade electroforetica relativa

**SDS** – Dodecil sulfato de sódio

**SNC** – Sistema nervoso central

**TBST** – Tampão Tris salino com detergente Tween



# Introdução



# **1. Introdução**

## **1.1 Obesidade: definição e caracterização**

A obesidade é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma epidemia global, dada a elevada prevalência em países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento <sup>[109]</sup>. Esta é uma das principais causas de morbilidade e mortalidade, contribuindo para gastos elevados dos sistemas de saúde. Depois do tabagismo, a obesidade é considerada a segunda causa de morte passível de prevenção <sup>[23]</sup>. Em Portugal mais de 14% da população é obesa e cerca de 40% tem excesso de peso <sup>[24]</sup>. Em conjunto, a prevalência de excesso de peso/obesidade aumentou de 49,6% (em 1995-1998) para 53,6% (em 2003-2005), o que sugere que os métodos actualmente existentes para o controlo de peso não se têm mostrado suficientemente eficientes <sup>[24]</sup>.

A obesidade é o resultado de uma complexa interacção entre factores genéticos, ambientais, comportamentais, fisiológicos e psicológicos. É uma condição que resulta de um balanço energético desajustado, em que a quantidade de energia (calorias) consumida é superior à quantidade de energia gasta. Na tabela 1 é apresentada a classificação dos indivíduos de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC), em conformidade com a OMS.

**Tabela 1 – Classificação do IMC e riscos associados de acordo com a OMS <sup>[109]</sup>**

Classificação	IMC (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>#</sup>	Riscos de co-morbilidades associados
<b>Baixo peso</b>	<18	Risco de problemas clínicos
<b>Normal</b>	18,5-24,9	-----
<b>Excesso de peso</b>	25-29,9	Elevado
<b>Obesidade Classe I</b>	30 – 34,9	Muito elevado
<b>Obesidade Classe II</b>	35-39,9	Muitíssimo elevado
<b>Obesidade classe III</b>	>40	Doença presente

<sup>#</sup> IMC = massa (Kg)/altura (metros<sup>2</sup>)

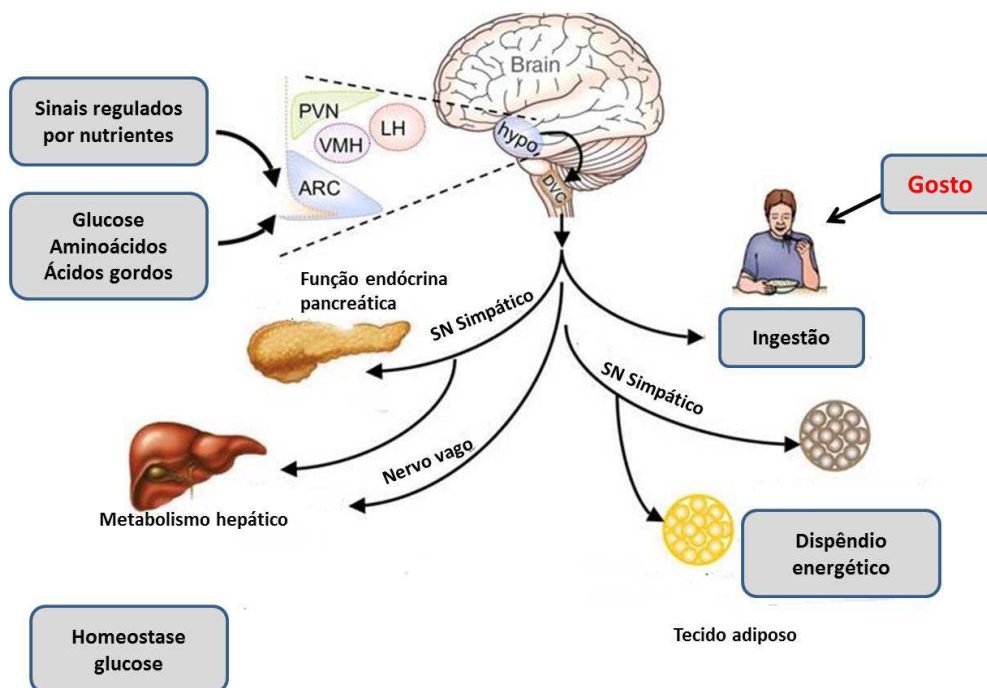
Ainda que a adopção de um estilo de vida que inclua uma actividade física regular e uma dieta balanceada seja importante na prevenção e tratamento da obesidade, é sabido que estes factores têm uma eficácia limitada a longo prazo. Muitas das observações em clinica mostram que, após algum tempo, muitos dos pacientes obesos submetidos a um programa de emagrecimento baseado em dieta alimentar e exercício físico voltam a uma dieta semelhante à que tinham antes de iniciar o tratamento, com escolha de alimentos mais calóricos e com características sensoriais mais intensas (nomeadamente alimentos doces e ricos em gordura).

## **1.2 Regulação do comportamento de ingestão e desenvolvimento da obesidade**

O comportamento alimentar, e mais concretamente a regulação da ingestão, é um processo complexo, determinado por diversos factores, como reflexos fisiológicos (mecanismos homeostáticos) e sensações de “prazer” (mecanismos hedónicos), os quais estão ainda associados a uma componente social e a determinantes culturais, demográficos, económicos, sociológicos, psicológicos, entre outros. Os estímulos sensoriais dos alimentos, em conjunto



com a regulação nervosa e uma grande diversidade de péptidos e hormonas intervêm no processo de decisão de “quando”, “quanto” e “o que” consumir (Figura 1).



**Figura 1 – Mecanismos envolvidos na regulação da ingestão alimentar.** hypo – hipotálamo; PVN – núcleo paraventricular, LH – hipotálamo lateral, VMH – hipotálamo ventro-medial, ARC – núcleo arqueado do hipotálamo (adaptado de Blouet e Schwartz, 2010 [6]).

Sinais neuronais, a nível do sistema nervoso central (SNC), e sinais periféricos interactuam na regulação do comportamento de ingestão. Existe uma regulação sistémica de longo prazo mediada principalmente pelas hormonas insulina (produzida pelas células beta-pancreáticas) e leptina (produzida maioritariamente pelo tecido adiposo) e que reflecte, em grande parte, as reservas em gordura do organismo [29]. Para além desta, no curto/médio prazo há a indução de saciedade através de uma acção nervosa e hormonal, ligada directamente à ingestão de alimentos. Uma diversidade de péptidos e hormonas a nível do tracto gastrointestinal intervêm na regulação da quantidade ingerida, na duração dos episódios de ingestão e na duração do intervalo entre estes. Os níveis circulantes destes péptidos/hormonas estão muito

dependentes da quantidade e do tipo de nutrientes ingeridos. Nos últimos anos, vários autores têm observado alterações na expressão de péptidos gastrointestinais na obesidade, sugerindo que estes têm um papel no desenvolvimento desta condição, podendo ter também potencial para o tratamento da mesma <sup>[29]</sup>.

A colecistocinina é um péptido produzido pelas células I do duodeno e íleo, maioritariamente em resposta a níveis elevados de proteínas e ácidos gordos. O seu efeito de inibição de ingestão é principalmente mediado pela sua acção a nível do nervo vago, que transmite a informação às áreas do SNC intervenientes no balanço energético. Adicionalmente, há também uma acção central directa deste péptido. A influência da colecistocinina na saciedade e, consequentemente na obesidade, é ilustrada por estudos em modelo animal que mostram que a falta de secreção, ou a ausência de receptores para este péptido, resultam em hiperfagia e obesidade <sup>[19]</sup>. Também em humanos foi observada uma relação entre os níveis de colecistocinina e o aumento de peso <sup>[116]</sup>.

O péptido 1 semelhante à glucagina (GLP-1) é expresso nas células L intestinais e a sua libertação inibe a ingestão. Esta acção é local, a nível de receptores presentes no nervo vago, e central, a nível de neurónios presentes no tronco cerebral <sup>[49]</sup>. Apesar do GLP-1 se apresentar como um forte indutor de saciedade, as características da dieta podem modular a sua acção. Estudos recentes referem que dietas ricas em gordura resultam numa fraca inibição da ingestão por parte deste péptido <sup>[110]</sup>, o que mostra o efeito de dietas obesogénicas na disrupção do comportamento de ingestão.

O péptido YY (PYY), também produzido pelas células L do intestino, é libertado na circulação durante as refeições inibindo a ingestão. O papel deste péptido na etiologia da obesidade é sugerido por estudos que mostram que indivíduos obesos apresentam níveis de PYY diminuídos <sup>[4, 112]</sup>.

A oxintomodulina é um outro péptido anorexigénico (indutor de saciedade) também produzido no intestino, cujo potencial no tratamento da obesidade foi referido por autores que observaram que a sua administração a ratos obesos induzia perda de peso <sup>[60]</sup>.

O único péptido gastrointestinal com acção orexigénica (indutor de apetite) é a grelina, produzida no estômago. Os seus níveis encontram-se aumentados no jejum, diminuindo ao longo da refeição. Ainda não são bem conhecidos os seus efeitos na obesidade, mas ao aumentar o apetite não é de excluir que possa potenciar a ingestão e o ganho de peso <sup>[86]</sup>.

A elevada prevalência de excesso de peso e obesidade, que se continuam a registar, vêm confirmar que muito há ainda por compreender em relação ao controlo da ingestão. Alterações nos níveis ou modo de acção de qualquer uma das diversas moléculas envolvidas na regulação do apetite e saciedade poderão contribuir para as alterações no apetite e hiperfagia normalmente associados à obesidade.

### **1.3. Importância da percepção dos alimentos no desenvolvimento da obesidade**

A complexidade dos mecanismos envolvidos na homeostase energética e no comportamento alimentar, descritos no ponto anterior, torna-se ainda mais evidente quando considerada a

percepção sensorial dos alimentos. Os mecanismos hedônicos associados ao valor de “recompensa” (ou prazer) estão inter-relacionados com a palatabilidade dos alimentos e podem, por si, afectar o controlo homeostático da ingestão. As escolhas bem como as quantidades ingeridas de um determinado alimento estão muito dependentes da percepção e avaliação hedónica. Quanto mais palatável for um alimento, maior a quantidade consumida, mesmo após as necessidades energéticas/nutricionais estarem satisfeitas <sup>[83]</sup>. Por outro lado, muitos dos sinais de apetite/saciedade, referidos anteriormente, condicionam a percepção a nível da cavidade oral e o valor de “recompensa” associado à ingestão.

O gosto contribui grandemente para a palatabilidade. Uma vez colocados na boca, os alimentos desencadeiam sensações químicas (gustativas) e mecânicas, as quais são dos factores que mais influenciam o comportamento de ingestão <sup>[5]</sup>. A forma como estas características são percebidas difere entre indivíduos, o que pode contribuir para diferenças nas escolhas alimentares. No caso concreto do sentido do gosto, é sabido que os indivíduos não apresentam todos a mesma sensibilidade.

A classificação dos indivíduos em super, medianamente ou não sensíveis aos gostos, foi adoptada com base na intensidade percebida do gosto amargo dos compostos feniltiocarbamida (PTC) e 6-n-propiltiouracilo (PROP), sensibilidade essa que mais tarde foi sugerida como estando relacionada com a percepção dos diversos gostos e sensações orais <sup>[103]</sup>. Vários estudos têm tentado relacionar o nível de sensibilidade gustativa com as escolhas alimentares e a obesidade, sugerindo a importância do sentido do gosto no processo de escolha das dietas e no desenvolvimento de patologias associadas <sup>[102]</sup>.

Nos anos 80, estudos de Drewnowski et al.<sup>[26]</sup> vieram suportar a existência de alterações na percepção e aceitação de soluções doces e ricas em gordura com o IMC, em que indivíduos com IMC mais elevado apresentariam maior preferência por este tipo de soluções. Vários outros autores referem também que indivíduos obesos apresentam alterações na percepção do gosto doce<sup>[3, 25]</sup>, e da gordura<sup>[96]</sup>, o que condiciona as suas preferências por alimentos ricos nos nutrientes associados a estas sensações. Por exemplo, Stewart et al.<sup>[96]</sup> observaram que indivíduos com IMC mais elevado apresentam uma incapacidade de perceber concentrações baixas de ácidos gordos, o que referiram estar associado a um consumo aumentado de alimentos ricos em gordura como manteiga, carnes, produtos lácteos, entre outros. Adicionalmente, estudos recentes referem a existência de polimorfismos a nível do receptor CD 36, o qual tem sido referido como receptor do potencial gosto de “gordura”. É sugerido que a presença de diferentes polimorfismos possa estar associada à escolha de alimentos ricos em gordura e, conseqüentemente, à obesidade<sup>[50]</sup>. De salientar, no entanto, que a gordura ainda não é considerada como um gosto básico, apesar de estudos em humanos<sup>[67]</sup> e em roedores<sup>[56]</sup> relatarem a existência dos referidos receptores a nível das células receptoras de gosto presentes nos gomos gustativos.

No que diz respeito a outros gostos básicos, Pepino et al.<sup>[78]</sup> sugeriram uma relação entre o peso corporal e a sensibilidade para o umami (associado aos alimentos ricos em proteínas), referindo que mulheres obesas apresentam menor sensibilidade para este gosto, mas preferem concentrações mais elevadas comparativamente a mulheres normoponderais.

Para além da possível influência directa da sensibilidade gustativa no desenvolvimento da obesidade, a existência de alterações na percepção dos alimentos é ainda reforçada por

estudos que mostram que o valor hedónico associado a um estímulo gustativo difere consoante o IMC. Szalay et al. <sup>[98]</sup> referiram que as zonas do SNC (mais concretamente do córtex cerebral) que respondem aos estímulos sensoriais dos alimentos diferem entre indivíduos obesos e normoponderais. Quando os indivíduos obesos são sujeitos a estímulos doces apresentam uma maior activação das zonas corticais responsáveis pelo reconhecimento do valor de “recompensa” dos gostos do que indivíduos normoponderais submetidos a um mesmo tratamento.

No início do presente ponto começou por se referir que a componente sensorial e hedónica podem ser suficientes para alterar a regulação homeostática do comportamento de ingestão. Da mesma forma, alterações a nível dos neurotransmissores, hormonas e péptidos gastrointestinais já referidos, poderão provocar também alterações no modo como os alimentos são percebidos e no valor hedónico dos mesmos. Isso significa que as alterações de apetite/saciedade normalmente subjacentes à obesidade estão inter-relacionadas com a percepção dos alimentos na cavidade oral. Através de estudos usando roedores como modelo animal, observou-se que decréscimos na secreção do péptido intestinal colecistocinina aumentam a avidez pelo gosto doce <sup>[23]</sup>. O facto das células dos gomos gustativos expressarem receptores de colecistocinina tem sugerido que a acção deste péptido na sensibilidade para o gosto doce possa ser também uma acção directa <sup>[42]</sup>. No mesmo sentido, vários autores referem potenciais alterações na percepção gustativa induzidas por sinais de apetite e saciedade como a leptina <sup>[115]</sup>, o PYY <sup>[44]</sup> e a grelina <sup>[91]</sup>. A expressão de receptores para leptina <sup>[89]</sup> e de receptores para o PYY <sup>[44]</sup> foi também observada nas células presentes nos gomos gustativos, indicando uma potencial acção destes péptidos no gosto.

#### **1.4 Cirurgia bariátrica: características gerais e efeitos nas escolhas alimentares**

O termo bariátrico foi adoptado em 1965 e deriva do prefixo grego *baro*, que significa peso, e do sufixo *iatros* que significa “os que praticam a medicina”. Assim, a cirurgia bariátrica passou a definir a cirurgia para o tratamento da obesidade <sup>[100]</sup>.

De entre as várias estratégias tentadas no combate à obesidade, a cirurgia bariátrica apresenta-se como a mais efectiva, quer na diminuição do IMC e massa gorda, quer no tratamento das co-morbilidades associadas a esta patologia. Com a cirurgia bariátrica conseguem-se perdas de peso significativas, o qual se mantém durante décadas, contrariamente ao que acontece com estratégias envolvendo o consumo de fármacos ou com as actuais estratégias que envolvem alterações nos hábitos alimentares e exercício físico.

Existem vários tipos de cirurgia bariátrica, os quais podem ser agrupados em três categorias principais: mal-absortivas, restritivas e mistas. Os diferentes tipos apresentam vantagens e desvantagens, sendo a sua escolha feita em função da avaliação das características de cada um dos indivíduos em termos de grau de obesidade, patologias associadas e perfil psicológico.

De entre os diversos tipos de cirurgia bariátrica, aquela abordada no presente trabalho é a gastrectomia vertical laparoscópica (*sleeve*). Este é um tipo de cirurgia bastante utilizado principalmente como terapêutica transitória nos doentes com obesidade mórbida e com co-morbilidades associadas para a obtenção de redução ponderal pré-cirúrgica, de forma a reduzir os riscos anestésicos-cirúrgicos de procedimentos posteriores como o *by-pass* gástrico do tipo Roux-en-Y <sup>[34]</sup>. Esta insere-se na classe das cirurgias predominantemente restritivas e

é um tipo de cirurgia que consiste em remover uma grande secção do estômago (cerca de 85%), passando este a ser uma estrutura pequena e de forma tubular, com a manutenção dos esfíncteres (cardia e piloro) que regulam a entrada e saída de alimentos. Este tipo de cirurgia, que normalmente é feita por via laparoscópica, é irreversível e provoca reduções da ordem dos 50% do excesso de peso em cerca de 6 meses <sup>[51]</sup>. Com a remoção do fundo gástrico, há uma diminuição na produção de grelina, a qual é uma hormona com efeitos orexigénicos (indutores de apetite), o que consequentemente poderá interferir nos processos regulatórios da saciedade. No entanto, os efeitos do *sleeve* a nível da produção de grelina ainda não estão completamente esclarecidos <sup>[82]</sup>.

De um modo geral, após cirurgia bariátrica os indivíduos parecem diminuir as preferências por alimentos muito doces ou com elevados teores de gordura. Ainda que grande parte das observações sejam feitas em clínica, nos últimos anos surgiram estudos em humanos e modelos animais que apontam nessa direcção. Por exemplo, foi observado que após cirurgia de *by-pass* gástrico os limiares de detecção do gosto doce diminuem, ou seja, os indivíduos passam a ter uma sensibilidade aumentada para concentrações baixas deste gosto <sup>[10, 69]</sup>. Também em modelo animal há sugestões de que o valor hedónico do gosto doce e das sensações associadas à gordura se alteram após cirurgia de *by pass* gástrico <sup>[40, 91, 104]</sup>. De qualquer modo, os efeitos da cirurgia bariátrica a nível da sensibilidade gustativa e/ou do valor hedónico dos alimentos não é consensual, havendo autores que referem diminuições no consumo de soluções com elevada concentração de glucose <sup>[40,104]</sup> ou ricas em gordura <sup>[91]</sup>, enquanto outros não encontram quaisquer alterações em termos de resposta a estes estímulos <sup>[57]</sup>. Apesar da maioria dos estudos se referirem a cirurgia de *by-pass* gástrico, um estudo recente apresenta resultados que vão no sentido de uma diminuição de preferências por



estímulos doces e gordura num modelo animal submetido a gastrectomia de *sleeve* <sup>[111]</sup>. Em conjunto, estes resultados sugerem que o tratamento cirúrgico da obesidade pode modular a ingestão ao interferir também na percepção dos alimentos.

A relação entre a cirurgia bariátrica e a percepção dos alimentos é ainda reforçada pelo facto da primeira estar associada a alterações nos níveis circulantes de péptidos e hormonas indutores de apetite/saciedade, os quais, por sua vez, e tal como foi referido ao longo desta introdução, parecem ter uma influência directa a nível das estruturas receptoras do gosto presentes na língua. Procedimentos cirúrgicos para perda de peso, como o *sleeve*, induzem o aumento das concentrações de agentes anorexigénicos, como colecistocinina, PYY ou o GLP-1 <sup>[81]</sup>. Já no que diz respeito à leptina, há uma diminuição considerável dos níveis em circulação após cirurgia bariátrica <sup>[9, 15]</sup>.

Para além destes péptidos e hormonas indutores de saciedade, o péptido orexigénico grelina também apresenta níveis alterados após a cirurgia de *sleeve*, tal como foi referido anteriormente. Estudos em murganhos apontam para uma diminuição na sensibilidade aos gostos salgado e ácido em consequência de reduções nos níveis de grelina <sup>[92]</sup>, sugerindo também uma influência desta na percepção dos alimentos.

Até ao presente a possibilidade de alterações na percepção dos alimentos em indivíduos obesos, e a sua modificação em consequência de tratamentos cirúrgicos para perda de peso, tem vindo a ser apresentada. As estruturas responsáveis pela recepção e tradução dos gostos (células receptoras do gosto, presentes nos gomos gustativos) são determinantes nesta percepção. No entanto, as características do meio oral, nomeadamente a composição da

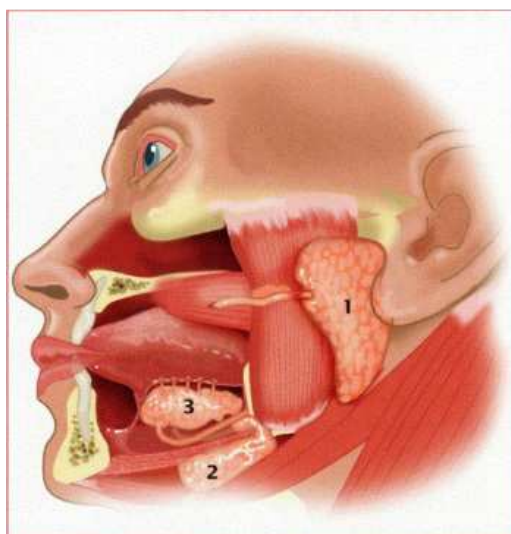
saliva, têm também uma contribuição importante, a qual tem vindo a ser estudado nos últimos anos [ex. 28, 74]. Neste contexto, alterações na composição da saliva poderão resultar em diferentes sensibilidades, preferências e consequentemente escolhas. Apesar da regulação das glândulas salivares ser quase exclusivamente atribuída ao sistema nervoso autónomo, há já estudos que apontam para uma contribuição hormonal nesta regulação. Foram referidas alterações na secreção salivar induzidas pela administração de hormonas e péptidos gastrointestinais como a secretina [45] e a colecistocinina [2, 30]. Adicionalmente, a presença de receptores de leptina nas glândulas salivares sugere uma potencial acção desta hormona na regulação da função salivar [7, 20]. Assim, e à semelhança do que foi referido para o sistema gustativo, as alterações nos sinais de apetite/saciedade que ocorrem em consequência da obesidade e/ou cirurgia bariátrica poderão contribuir para alterações na composição salivar. No entanto, este tema nunca foi muito explorado.

## **1.5 Saliva**

A saliva é um dos fluidos corporais mais complexos, com variadas funções. No tracto digestivo, a saliva desempenha papéis importantes em termos de protecção (cavidade oral e esófago), digestão (através da presença de enzimas), mastigação, fala, deglutição, lubrificação, e protecção anti-microbiana [59].

A saliva é um fluido constituído maioritariamente por água (cerca de 99%), por electrólitos e proteínas. A fracção orgânica é principalmente constituída por proteínas, e a parte inorgânica por iões como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{NH}_3^+$ , habituais na maioria dos restantes fluidos orgânicos [1].

A saliva resulta da secreção de três pares de glândulas salivares maiores (parótidas, submandibulares e sublinguais) (Figura 2) e de numerosas glândulas salivares menores (ex. linguais, palatinas, etc.), distribuídas pela língua e mucosa oral. Para a saliva mista contribuem ainda constituintes provenientes do fluido crevicular, do sangue, células e microorganismos <sup>[1]</sup>.

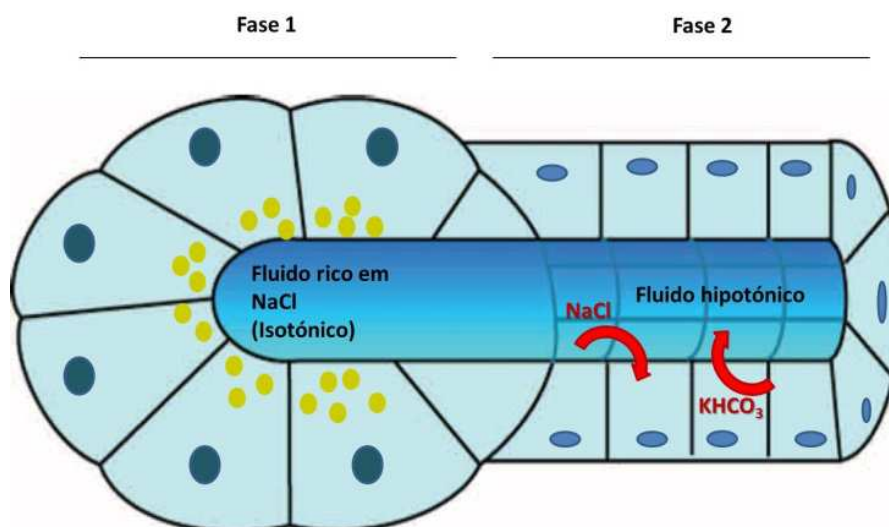


**Figura 2 – Localização anatômica das glândulas salivares maiores.** 1–parótidas, 2-submandibulares, 3-sublinguais (retirado de Aps e Martens, 2005 <sup>[1]</sup>)

As glândulas diferem no tipo de secreção que produzem, o que está relacionado com o tipo de células acinares presentes: serosas ou mucosas. As células serosas constituem os ácinos das glândulas parótidas, estando presentes em menor quantidade nas glândulas submandibulares e ainda menor nas glândulas sublinguais. Constituem ainda as glândulas (menores) de Von Ebner, presentes na língua. O tipo de secreção destas células é um fluido aquoso, essencialmente desprovido de muco. Esta secreção é grandemente activada por estimulação associada à ingestão de alimento. No que diz respeito às células mucosas, estão presentes nas glândulas submandibulares, glândulas sublinguais e na maior parte das glândulas salivares menores do palato, língua e lábios. A sua secreção é rica em mucinas, o que lhe confere

propriedades de viscosidade e elasticidade, sendo um contributo importante para o total de saliva que entra na cavidade oral em situação de repouso <sup>[87]</sup>.

De um modo simplificado, a formação e secreção de saliva ocorre em duas fases distintas. Numa primeira fase as células acinares produzem uma saliva primária, com composição semelhante à do plasma, enquanto que numa segunda fase este fluido primário rico em NaCl é modificado durante a sua passagem ao longo dos ductos, onde a maior parte do NaCl é reabsorvido e há a secreção de carbonato de potássio, tornando a saliva final um fluido hipotónico em relação ao sangue <sup>[14, 106]</sup>. O processo de formação de saliva está esquematicamente representado, de uma forma simplificada, na figura 3.



**Figura 3 – Representação esquemática do processo de secreção salivar** (adaptado de Catalán et al., 2009 <sup>[14]</sup>)

### **1.5.1 Papel da saliva na percepção e aceitação dos alimentos**

A interacção entre gosto-saliva é bem percebida pelo facto desta última ser o fluido onde os constituintes dos alimentos são dissolvidos e através do qual são transportados para os locais de recepção do gosto <sup>[95]</sup>. Por outro lado, a saliva tem ainda um papel de protecção das próprias células gustativas e restantes estruturas da cavidade oral <sup>[95]</sup>.

A nível de sensações orais não gustativas, como a adstringência, o papel das proteínas salivares é reconhecido, existindo diversos estudos em humanos <sup>[ex. 58]</sup> e outras espécies animais <sup>[ex. 54, 55]</sup> que mostram a interacção entre o perfil proteico da saliva e a ingestão de compostos adstringentes. Muito do que é conhecido acerca dos mecanismos de adstringência baseia-se em estudos com taninos, que se têm concentrado na interacção de polifenóis com proteínas salivares ricas em prolina (PRPs), as quais constituem uma classe específica de proteínas com elevadas quantidades do aminoácido prolina e com grande afinidade para complexar polifenóis <sup>[62]</sup>.

Nos últimos anos têm surgido alguns estudos com o objectivo de identificar proteínas salivares envolvidas na percepção/sensibilidade para os gostos básicos (doce, salgado, amargo, ácido e umami). Vários estudos apontam no sentido de indivíduos com diferentes sensibilidades gustativas apresentarem diferentes perfis proteicos salivares <sup>[11, 12, 28]</sup>. Em grande parte destes estudos a sensibilidade gustativa tem sido avaliada com base na percepção do gosto amargo (ex cafeína <sup>[28]</sup> e PROP <sup>[11]</sup>), havendo também autores que relacionam a sensibilidade para a gordura com o perfil proteico salivar <sup>[75]</sup>.

A proteína salivar que tem merecido mais atenção como interveniente no processo de detecção e percepção do gosto é a anidrase carbónica VI. Ainda nos anos 70 foi descrita a presença desta proteína na saliva e o seu envolvimento na ligação ao zinco e na sensibilidade gustativa. Nesta altura esta proteína recebeu o nome de “gustin” <sup>[39]</sup>, e só mais tarde foi identificada como anidrase carbónica VI <sup>[103]</sup>. A anidrase carbónica VI é a única proteína da família das anidrases carbónicas que se sabe ser excretada, apresentando várias propriedades que a distinguem das formas citoplasmáticas <sup>[72]</sup>. Várias têm sido as funções atribuídas a esta proteína, nomeadamente a regulação do pH salivar e capacidade tampão da saliva <sup>[33, 47]</sup>, protecção dos dentes contra cáries <sup>[52]</sup> e manutenção do pH do esófago <sup>[77]</sup>.

Recentemente um grupo de investigadores italianos <sup>[12]</sup> mostrou evidências do envolvimento desta proteína na sensibilidade gustativa em geral, ao observar que os indivíduos que apresentavam polimorfismos no gene que a codifica (polimorfismos esses associados a uma perda de funcionalidade do local da proteína que liga zinco) eram aqueles que apresentavam uma menor sensibilidade gustativa e uma menor densidade de gomos gustativos.

A proteína  $\alpha$ -amilase salivar é uma das proteínas existentes em maior quantidade na saliva humana, sendo principalmente sintetizada pelas glândulas parótidas. Os níveis de expressão desta proteína dependem de diversos factores, como os hábitos alimentares <sup>[79]</sup>, percepção de saciedade <sup>[41]</sup> e actividade do ramo simpático do sistema nervoso autónomo <sup>[68]</sup>. Apesar do papel da amilase salivar na sensibilidade gustativa estar ainda pouco estudado, alguns autores já referiram o envolvimento desta proteína na percepção de alimentos, nomeadamente pela influência na viscosidade percebida de amido <sup>[63]</sup> e na textura de alimentos semi-sólidos <sup>[31]</sup>. Há ainda um estudo recente que refere a presença de receptores de gosto nas células acinares

e ductais das glândulas salivares, e que sugere uma possível regulação da secreção de amilase por parte destes <sup>[16]</sup>. A confirmar-se esta regulação, este facto ajuda a reforçar a existência de uma inter-relação entre a expressão de amilase salivar e a percepção gustativa.

### **1.5.2 Outras funções salivares potencialmente alteradas com a obesidade**

Na última década o estudo da componente proteica da saliva teve um grande incremento principalmente devido ao seu potencial como fonte de biomarcadores de estados patofisiológicos, apresentando vantagens relativamente ao sangue dada a possibilidade de utilizar métodos não invasivos e não indutores de stress para a sua recolha. Isto, juntamente com os avanços na área da proteómica, permitiram um conhecimento mais completo acerca das espécies proteicas presentes na saliva e das suas funções.

Tal como foi referido anteriormente, um dos principais papéis da saliva é a defesa e protecção dos tecidos e estruturas presentes na cavidade oral. Existem diversas proteínas salivares para as quais as funções de protecção são reconhecidas. PRPs acídicas, amilase salivar, staterinas, entre outras, são proteínas salivares envolvidas na protecção dos dentes <sup>[108]</sup>. As mucinas salivares estão também bastante envolvidas na protecção da cavidade oral, protegendo os tecidos da mucosa <sup>[99]</sup>.

Várias doenças orais têm sido associadas à obesidade, nomeadamente uma maior incidência de cáries e doença periodontal <sup>[65]</sup>. Grande parte dos autores atribuem estas alterações à composição da dieta deste tipo de indivíduos, a qual frequentemente é rica em alimentos

doces e/ou ricos em gordura. No entanto, não é de excluir que existam alterações na função salivar, uma vez que as características da saliva afectam a saúde oral.

No caso de doenças metabólicas, a função salivar está principalmente estudada na diabetes [ex. 13, 84]. No caso da obesidade, esta está muito menos estudada na obesidade, possivelmente devido ao facto desta poder ter diferentes etiologias. No entanto, há alguns estudos que referem a comparação da função salivar entre indivíduos obesos e normoponderais. Embora nalguns estudos não tenham sido observadas alterações no padrão de salivação por indivíduos obesos em resposta à apresentação de alimentos palatáveis <sup>[81]</sup>, alguns autores observaram diferenças no volume produzido em resposta a um estímulo <sup>[32]</sup>.

Estudos mais recentes também suportam a existência de alterações na função salivar com a obesidade, ao observarem diferenças em vários parâmetros salivares. Um estudo feito com crianças e adolescentes indica que, nestas faixas etárias, tanto o excesso de peso como a obesidade estão relacionados com alterações em parâmetros salivares como concentrações de fosfato, ácido siálico livre e actividade da enzima peroxidase, ou seja, com factores que favorecem o desenvolvimento de cáries <sup>[76]</sup>. Por sua vez, Tremblay et al. <sup>[105]</sup> observaram diferenças no pH salivar em mulheres obesas, ao estudar a síndrome metabólica, sugerindo que este parâmetro salivar poderá ter importância como marcador.

Apesar destes vários estudos que apontam para a possibilidade de alterações na salivação com a obesidade, pouco é conhecido acerca de alterações a nível da composição proteica deste fluido. Estudos no sentido de conhecer as variações no proteoma da saliva na obesidade e numa situação de peso induzida por cirurgia bariátrica são relevantes para uma maior



compreensão dos eventos a nível da cavidade oral, os quais se poderão relacionar com o comportamento de ingestão. Ao mesmo tempo, esse tipo de variações poderá ajudar a compreender algumas das alterações metabólicas presentes numa patologia complexa como a obesidade.



# Objetivos



## 2. Objectivos

O presente estudo tem como objectivo contribuir para o conhecimento das alterações existentes na composição proteica salivar de mulheres obesas, relativamente a pares normoponderais, e avaliar se as potenciais alterações se mantêm numa situação de perda de peso resultante de cirurgia bariátrica de gastrectomia vertical (*sleeve*).

Objectivos específicos:

1. Comparar os perfis proteicos da saliva mista entre mulheres obesas não submetidas e submetidas a cirurgia bariátrica e mulheres normoponderais, através de técnicas de separação de proteínas, unidimensionais, de acordo com a sua massa molecular (SDS-PAGE) e bidimensionais, de acordo simultaneamente com o seu ponto isoelectrico e a sua massa molecular.
2. Aumentar a compreensão das características da saliva que poderão modificar a percepção dos alimentos e/ou relacionar-se com a escolha da dieta, nomeadamente a nível de proteínas salivares com papel reconhecido na percepção gustativa, através de:
  - 2.1 Avaliação e comparação da actividade enzimática e expressão proteica da proteína amilase salivar nos três grupos experimentais referidos.
  - 2.2 Avaliação e comparação da expressão proteica da proteína anidrase carbónica VI salivar nos três grupos experimentais referidos.



# **Materiais e Métodos**





### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 População e recolha das amostras de saliva**

Este estudo teve como participantes 18 pacientes do género feminino, do Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, do Hospital de Santa Maria, abordados durante as consultas de obesidade. Destes, 7 haviam sido submetidos a cirurgia bariátrica, apresentando IMCs compreendidos entre 28,3 e 43,9 e com perdas de peso compreendidas entre 30 e 50 Kg. Dos restantes 11 indivíduos, não submetidos a cirurgia bariátrica, alguns encontravam-se ainda no início de um processo de perda de peso induzida por alterações do estilo de vida, enquanto outros não estavam ainda em processo de perda de peso. Mesmo no caso dos indivíduos que estavam em perda de peso, esta não excedeu os 20 Kg, sendo muito inferior a esta quantidade para a grande maioria (tabela 2, secção de resultados). Estes 11 indivíduos apresentavam IMCs compreendidos entre 36,5 e 57,9. Catorze indivíduos do género feminino, normoponderais ( $18 < \text{IMC} < 25 \text{ kg/m}^2$ ), seleccionados ao acaso, foram utilizados como controlos. Os indivíduos em estudo apresentavam idades compreendidas entre 23 e 58 anos.

A todos os indivíduos foi solicitada, pessoalmente, a sua participação, tendo sido previamente informados dos objectivos do estudo. Os participantes assinaram um consentimento informado, formalizando a sua participação (Anexo I) e preencheram um questionário (Anexo II).

As recolhas de saliva foram feitas no Hospital de Santa Maria, em três dias diferentes, no período compreendido entre as 15 e as 17h, garantindo a existência de pelo menos 1 hora de intervalo entre o consumo de alimentos ou bebidas (excepto água) e a recolha.

Os participantes foram instruídos para bochechar durante uns segundos com água mineral, de modo a lavar a boca de restos de alimentos, produtos de descamação da mucosa oral e resíduos de saliva. Após esta lavagem foi pedido que toda a saliva produzida, sem estimulação, fosse deitada de forma passiva para um copo mantido em gelo. As recolhas decorreram durante períodos compreendidos entre 3 e 5 minutos, para garantir a recolha de um volume de, pelo menos, 1,5 mL. As amostras foram transportadas em gelo para o laboratório, sendo armazenadas a -20°C para análise posterior.

A realização deste estudo foi aprovada pelo Comité de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

### 3.2 Preparação das amostras e determinação da concentração em proteína total

Antes da análise da composição proteica, as amostras de saliva mista foram descongeladas e centrifugadas (13000 g, 4°C, 30 minutos). Este passo de centrifugação tem como principal objectivo precipitar e remover restos de partículas alimentares e células, bem como mucinas que contribuem para a viscosidade da saliva, dificultando a pipetagem homogénea das amostras. O sobrenadante foi recolhido e dividido em alíquotas, de modo a evitar ciclos de congelação-descongelação das amostras ao longo das diversas análises.

Para determinação da concentração em proteína total das amostras foi utilizado o método de Bradford. O método baseia-se na alteração da absorvância do corante de ligação, *Coomassie Brilliant Blue G 250*, em meio ácido, em que a sua coloração avermelhada se converte numa forma azulada quando se liga à proteína. O máximo de absorção para o corante varia entre os 495nm e 595nm, sendo que o aumento da

absorvância é proporcional à quantidade de corante ligado e, consequentemente, à concentração de proteína presente na amostra.

As determinações foram feitas em microplacas de 96 poços. Para traçar a curva padrão, a partir da qual foram calculadas as concentrações das amostras, por interpolação gráfica, utilizaram-se soluções de albumina de soro bovino (BSA) com concentrações de 50, 100, 200, 350 e 500  $\mu\text{g/mL}$ .

O protocolo consistiu na aplicação de 10  $\mu\text{L}$  de amostra, ou solução de proteína padrão, em cada poço da microplaca, em triplicado. A cada um dos poços foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay). A placa foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se a leitura de absorvância a um comprimento de onda de 630 nm, num leitor de microplacas (ELX 800, Biotek). A leitura foi feita a um comprimento de onda de 630 nm, por ser este o disponível mais próximo do intervalo de absorção máximo para o corante, e após confirmação que a este comprimento de onda a absorção do composto continuava a ser elevada e que se mantinha proporcionalidade entre a absorvância e a quantidade de proteína.

### 3.3 Perfil proteico SDS PAGE

Para separação das proteínas de acordo com as suas massas moleculares, foi utilizada electroforese unidimensional em condições desnaturantes, em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Foram preparados géis de 8 X 10 cm e 0,75mm de espessura, com 12% poliacrilamida. O volume de cada amostra a aplicar foi calculado de modo a aplicar 7,5  $\mu\text{g}$  de proteína. Cada amostra foi misturada com tampão de amostra (0,125M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS

(v/v), 5% 2-mercaptoetanol, 20% glicerol; 0,002% (m/v), 0,0002g azul de bromofenol) e incubada a 95°C, em banho seco, durante 5 minutos, após os quais foram colocadas em gelo, até aplicação no gel.

Para além dos poços contendo as amostras, em cada gel foram aplicados 5µL de um marcador de massas moleculares (Dual Color, BioRad, Ref 161-0324). Os reservatórios superior e inferior foram cheios com tampão de corrida [0,025M Tris, 0,192M glicina, 1% (m/v) SDS] e a corrida electroforética decorreu a uma voltagem constante de 150 V até a frente de corrida atingir o fim do gel.

Os géis foram corados, durante 2 horas, em corante Azul de Coomassie [0,1% *Coomassie Brilliant-Blue* R-250 em 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético] e posteriormente descorados em várias lavagens com uma solução de 20% metanol, 10% (v/v) ácido acético. Os géis foram digitalizados utilizando um *scanner* (ScanJet 3400C HP) para posterior análise de Imagem através do *software* Gel Analyzer.

Para a análise dos géis SDS PAGE foram marcadas todas as bandas correspondentes a cada *lane* (ou seja, correspondentes a cada amostra) e calculados os volumes relativos dessas bandas. Esses volumes foram comparados entre as diferentes amostras. A comparação dos volumes relativos das bandas, sendo um valor respeitante à expressão total, tem a vantagem (comparativamente à comparação da intensidade) de estar “corrigido” para alguma variação que exista na quantidade de proteína aplicada.

### 3.4 Electroforese bi-dimensional (2-DE)

Para os perfis proteicos bi-dimensionais foram analisadas 3 amostras individuais de cada grupo experimental (indivíduos normoponderais, obesos submetidos a cirurgia e

obesos não submetidos a cirurgia) e *pools* de cada um dos grupos. Os *pools* foram constituídos a partir de amostras de 5 indivíduos diferentes. A quantidade de cada amostra individual, constituinte do *pool*, foi calculada de modo a que cada indivíduo contribuísse com a mesma quantidade de proteína. Tendo em conta que, para cada gel, se aplicaram 160 µg de proteína total, cada amostra contribuiu para o pool com 32 µg. Para cada *pool* foram feitos 2 géis diferentes.

O procedimento experimental consistiu, numa primeira fase, em concentrar as amostras (quer individuais, quer *pools*) através da centrifugação em membranas com um *cut-off* de 3 kDa. A concentração foi feita a 4°C e a uma rotação de 14000 g pelo tempo necessário para ter a quantidade de proteína de interesse (no caso 160 µg) num volume inferior a 50 µL. Após concentração, o volume de amostra (ou *pool*) obtido foi misturado com tampão de solubilização [7M ureia, 2M tioureia, 4% (m/v) 1-propanosulfonato de 3-(3-colamidopropil) dimetilamónio (CHAPS), 2% (v/v) mistura de anfólitos (IPG buffer, GE healthcare), 40mM ditioneitol (DTT)], no volume necessário para, em conjunto com a amostra, perfazer um total de 250 µL. Esta mistura foi deixada a incubar à temperatura ambiente durante 1h, após o que foi centrifugada, durante 10 minutos a 10°C, a uma velocidade de 10000 rpm. O sobrenadante de cada amostra foi recolhido e aplicado numa das ranhuras do suporte para tiras, do sistema Multiphor II (GE healthcare). Foram usadas tiras de gel, pré-compradas, com gradiente de pH 3-11 NL de 13 cm (IPG strips, GE healthcare). As tiras foram colocadas em contacto com a amostra, em re-hidratação passiva *overnight*, à temperatura ambiente e cobertas com óleo mineral (Dry strip cover fluid, GE healthcare).

Após re-hidratação, as tiras foram colocadas no sistema Multiphor II, para focagem isoelectrica das proteínas (primeira dimensão). A focagem ocorreu a uma temperatura constante de 20°C de acordo com o seguinte programa: passo 1 – subida para 150V

(0:01h), passo 2 - 150V (1:00h), passo 3 – subida para 300V (0:30h), passo 4 – 300V (1:30h), passo 5 – subida para 3500V (4:00h), passo 6 – 3500V (6:00h).

No final da focagem, cada tira foi colocada num tubo de ensaio com tampa de rosca e armazenada a -20°C, até realização da segunda dimensão (SDS PAGE).

Para separação, por massas moleculares, das proteínas previamente separadas de acordo com os seus pontos isoeléctricos, cada tira foi sujeita a dois passos de equilíbrio de 15 minutos cada. A solução de equilíbrio consistiu em 6M ureia, 75mM Tris-HCl pH 8.8, 29,3% (v/v) glicerol, 2% (m/v) SDS e 0,002% (m/v) de azul de bromofenol. Para o primeiro passo (de redução) foi adicionado, a esta solução, DTT, a uma concentração final de 1% (m/v) e para o segundo passo (de alquilação) foi adicionada iodoacetamida, a uma concentração final de 2,5% (m/v).

Após os dois passos de equilíbrio cada tira foi lavada com tampão de corrida (com a mesma composição já descrita na secção referente à separação proteica por SDS PAGE) e colocada no topo de um gel de 12% de poliacrilamida (16 X 16 cm e 1 mm de espessura). A tira foi imobilizada no gel de segunda dimensão através da adição de uma solução 0,5% (m/v) de agarose. Nalguns géis foi ainda aplicado marcador de massas moleculares (Dual Color, BioRad, Ref 161-0324).

A corrida electroforética decorreu numa tina vertical (Protean XL, Bio-Rad), a uma temperatura constante de 20°C e a uma voltagem inicial de 50V (durante 30 minutos), seguida de voltagem constante a 150V até a frente de corrida atingir o fim do gel.

Os géis foram corados com uma solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* e descorados seguindo um protocolo semelhante ao descrito na secção referente à obtenção do perfil proteico por SDS PAGE.

Os géis foram digitalizados através do *scanner* ImageScanner III (GE Healthcare) e a análise feita através da utilização do *software* ImageMaster Platinum (GE Healthcare).

Em termos gerais, para a análise de géis, foi feita a detecção automática de *spots*, tendo a mesma sido corrigida, com a edição dos *spots* que não foram correctamente assinalados, a adição de *spots* não assinalados e a eliminação de artefactos assinalados como *spots*. Posteriormente fez-se a correspondência (*match*) de *spots* entre os diferentes géis em comparação. Esta análise foi feita para os géis correspondentes aos *pools*. Foi comparada a percentagem de volume de cada *spot*, de modo a normalizar para pequenas diferenças que pudessem existir na quantidade de proteína corrida em cada gel. Os resultados obtidos através da análise dos *pools* foram posteriormente confirmados através da observação dos géis individuais. Só foram consideradas como *spots* diferencialmente expressos entre os grupos, aqueles cujo resultado foi confirmado nos géis individuais.

O cálculo das massas moleculares aparentes foi feito através do conhecimento das massas moleculares das proteínas presentes no padrão utilizado. Foi traçada uma curva entre o logaritmo da massa molecular e a mobilidade electroforética relativa (*Rf*) das proteínas presentes no padrão. As massas moleculares das proteínas de interesse foram calculadas por interpolação gráfica.

O cálculo dos pontos isoeléctricos aparentes foi feito por interpolação gráfica a partir de uma curva *standard* para tiras de 3-11 NL (Anexo III).

### 3.5 Actividade enzimática da $\alpha$ -amilase salivar

A determinação da actividade enzimática da proteína  $\alpha$ -amilase salivar foi feita através da utilização de um kit colorimétrico de determinação enzimática, (Amilase Líquida; Ref 17632H; Sentinel Diagnostics). O kit baseia-se na hidrólise do substrato (*p*-nitrofenil etilideno- $\alpha$ ,D-maltoheptose) (presente no kit) pela amilase (presente na amostra), com a formação de produtos de degradação, os quais são posteriormente hidrolisados a *p*-nitrofenol e glucose através da acção da enzima  $\alpha$ -glucosidase (presente no kit). A formação de *p*-nitrofenol é proporcional à actividade de amilase da amostra, sendo esta formação determinada espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 405 nm.

Uma vez que este kit não foi especialmente formulado para amostras de saliva, as concentrações ideais de amostras de saliva a aplicar, de modo a garantir a linearidade do método (ou seja, de modo a garantir que há proporcionalidade entre a actividade de amilase presente na amostra e a formação de produtos de reacção) foram previamente testadas. Para uma amostra de saliva de indivíduos normoponderais e para uma amostra de saliva de indivíduos obesos testaram-se diferentes diluições, de onde se observou existir linearidade para concentrações de proteína entre 2 e 12  $\mu\text{g/mL}$ . Tendo em conta as concentrações proteicas das amostras de saliva em estudo, e tendo em conta possíveis diferenças na actividade enzimática por quantidade de proteína total, entre diferentes indivíduos, para cada amostra usaram-se diluições de 100, 200, 300, 400 e 500x.

O protocolo utilizado seguiu as recomendações do fabricante do kit, com ligeiras adaptações. Resumidamente, 8  $\mu\text{L}$  de cada uma das diluições de saliva foram misturados com 200  $\mu\text{L}$  do reagente 1 (contendo  $\alpha$ -glicosidase). Após 2 minutos de incubação à temperatura ambiente foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do reagente 2 (contendo o



substrato) e feita leitura cinética (leituras de absorvância de minuto a minuto) a 405 nm, durante 20 minutos, à temperatura ambiente.

O protocolo foi realizado em placas de 96 poços, com cada uma das amostras (e respectivas diluições) aplicadas em triplicado. Em cada uma das placas foi ainda aplicada uma solução de calibração e duas soluções “controle de qualidade”, também em triplicado. Estas soluções permitiram traçar uma curva de calibração para cada uma das placas, a qual permitiu os cálculos das actividades, por interpolação.

Para as curvas de reacção obtidas observou-se linearidade entre os 5 e 10 minutos, pelo que foi esta a zona considerada em todas as amostras e padrões para os cálculos dos declives e, conseqüentemente, dos valores de actividade.

### 3.6 Imunomarcacão das proteínas $\alpha$ -amilase salivar e anidrase carbónica VI (Western Blot)

Para imunomarcacão das proteínas  $\alpha$ -amilase salivar e anidrase carbónica VI, 3  $\mu$ g de proteína de cada uma das amostras foram separados por electroforese SDS PAGE. O procedimento para separação proteica por SDS PAGE é igual ao descrito na secção referente a essa técnica.

Após separação electroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de difluoreto de polivilideno (PDVF). A membrana foi activada através de imersão, durante 5 segundos, em metanol, seguidos de 5 minutos em água destilada e 10 minutos em tampão de transferência (25 mM Tris-HCl pH8.3, 192 mM glicina, 20% (v/v) metanol, 0,037% (m/v) SDS). Para a transferência, em cada cassete, foram colocados os seguintes elementos (já humedecidos em tampão de transferência) pela seguinte ordem:

placa de fibra, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro e placa de fibra. A transferência foi feita a uma corrente constante de 350 mA, durante 1 hora.

Após a transferência, as membranas foram lavadas 2 minutos em água destilada, coradas com o corante Ponceau S [20% (m/v) reagente Ponceau; 3% ácido acético], durante 10 minutos, e lavadas novamente em água destilada, até se tornarem visíveis as bandas rosadas. Este passo de coloração teve como objectivo confirmar a transferência das proteínas do gel para a membrana e avaliar a homogeneidade em termos de quantidade de proteína aplicada em cada *lane*.

Após o passo de coloração, as membranas foram colocadas em solução de bloqueio [5% (m/v) leite em pó magro em tampão tris salino com *tween* (TBS-T)], durante 2 horas, à temperatura ambiente e com agitação. Posteriormente foram incubadas com anticorpo primário (anti- $\alpha$ -amilase salivar (sc-46657, Santa Cruz), ou anti-anidrase carbónica VI (sc-99173, Santa Cruz) consoante o objectivo). A incubação com anticorpo primário foi feita *overnight*, a 4°C, com agitação. Ambos os anticorpos primários foram preparados em diluições de 1:200, em TBS-T.

Após incubação com o anticorpo primário as membranas sofreram 3 lavagens de 15 minutos cada, numa solução 0,5% leite em pó magro em TBS-T. Seguiu-se a incubação com anticorpo secundário (diluição 1:10000 para ambos os anticorpos primários), em TBS-T, durante 2 horas à temperatura ambiente e com agitação e posteriores lavagens em 0,5% leite em pó magro em TBS-T (3 lavagens de 15 minutos cada).

Para a revelação, as membranas foram colocadas em contacto com o substrato quimiofluorescente fosfatase alcalina, durante 2 minutos. Retirou-se o excesso de líquido e procedeu-se à aquisição de imagem num transiluminador (Geldoc EQ170, Bio-Rad).

As membranas foram analisadas através da utilização do *software* Quantity One (Bio-Rad). As bandas marcadas foram assinaladas e comparados os valores dos volumes ajustados. Tendo em conta a existência de alguma variabilidade entre diferentes membranas, foram calculados os rácios entre os volumes obtidos para uma mesma amostra presente em membranas diferentes. Com estes foi possível fazer o ajuste dos valores dos volumes de cada banda marcada, de modo a poder comparar amostras presentes em membranas diferentes.

### 3.7 Tratamento estatístico dos resultados

Os diferentes parâmetros em estudo foram analisados através de estatística descritiva. A existência de distribuição normal e a homoscedasticidade foram testadas, respectivamente, pelas metodologias Kolmogorov-Smirnov e Levene. As variáveis foram testadas por Análise de Variância – de acordo com modelo geral linear (GLM) com  $x$  factores fixos. Sempre que as diferenças foram significativas as médias foram comparadas, utilizando o teste de Duncan.

As correlações de Pearson, para diferentes variáveis, foram consideradas tendo em conta o nível de significância e o valor de  $R$ .

As diferentes análises estatísticas foram realizadas através da utilização do *software* NCSS 2001 e as diferenças foram consideradas significativas para um intervalo de confiança de 95% ( $P < 0,05$ ).



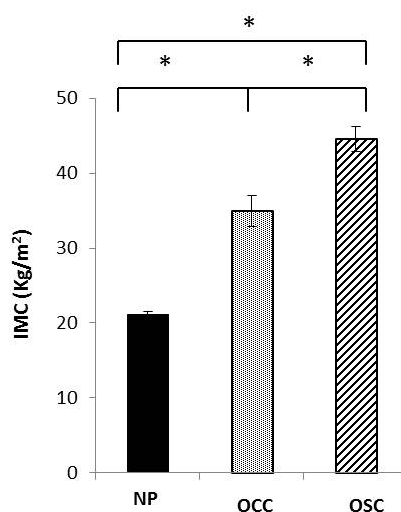
# **Resultados**



## 4. Resultados

### 4.1 Características da população em estudo

No presente estudo a composição proteica da saliva foi comparada entre mulheres normoponderais (NP), mulheres obesas submetidas a cirurgia bariátrica (OCC) e mulheres obesas não submetidas a esse tipo de cirurgia. As características da população estudada estão descritas na tabela 2. À data das recolhas de saliva, os indivíduos apresentavam idades compreendidas entre 22 e 58 anos, não havendo diferenças entre os grupos para este parâmetro. Já em termos de IMC, os três grupos apresentavam valores significativamente diferentes ( $21,1 \pm 0,5$ ;  $34,9 \pm 2,1$  e  $44,6 \pm 1,7$  Kg/m<sup>2</sup> (média  $\pm$  erro padrão da média), normoponderais, OCC e OSC, respectivamente) (Figura 4).



**Figura 4 – Índices de massa corporal dos 3 grupos em estudo (média  $\pm$  erro padrão).** NP – indivíduos normoponderais; OCC – indivíduos obesos submetidos a cirurgia bariátrica; OSC – indivíduos obesos não submetidos a cirurgia bariátrica. \* Foram observadas diferenças significativas entre todos os grupos para  $P < 0,05$ .

**Tabela 2 – Características da amostra estudada**

Grupos	ID amostra	Idade	Peso final*(kg)	Altura (m)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Perda de peso*(kg)
OSC	6	56	95	1,55	39,54	20
	7	41	109	1,73	36,42	0
	10	33	120	1,65	44,08	0
	12	42	123	1,65	45,18	0
	14	36	123	1,63	46,29	20
	15	53	116	1,6	48,91	11
	17	58	106	1,58	42,46	8
	18	46	112	1,57	45,44	0
	19	58	87	1,45	41,38	0
	20	32	104	1,59	41,14	0
	21	24	154	1,63	57,96	10
	23	22	101	1,57	40,98	0
OCC	1	58	81,5	1,58	32,65	50
	2	56	87	1,54	36,68	30
	3	41	87	1,6	33,98	33
	9	37	114	1,7	39,45	31
	11	29	130	1,72	43,94	30
	16	52	79	1,64	29,37	50
	22	36	81	1,69	28,36	50
NP	1	38	65	1,68	23,03	
	2	42	50	1,62	19,05	
	3	34	56	1,75	18,29	
	4	22	56	1,68	19,84	
	5	63	57	1,6	22,27	
	6	56	46	1,49	20,72	
	7	40	55	1,62	20,96	
	8	35	68	1,7	23,53	
	9	42	61	1,64	22,68	
	10	23	69	1,75	22,53	
	11	24	49	1,63	18,44	
	12	31	50	1,58	20,03	
	13	23	63	1,67	22,59	
	14	25	57	1,62	21,72	

\*valores à data da recolha

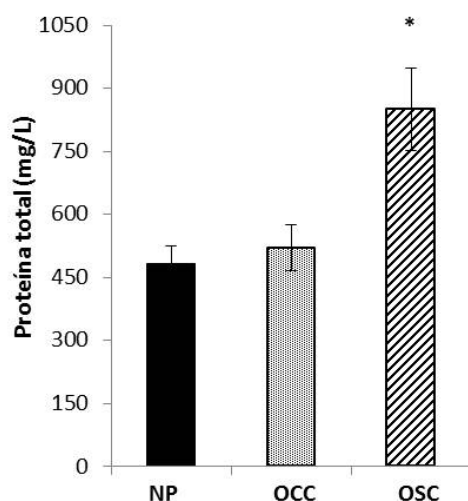
Os indivíduos submetidos a cirurgia bariátrica apresentaram perdas de peso compreendidas entre 30 e 50 Kg, enquanto muitos dos indivíduos OSC não apresentaram qualquer perda de peso (N=7) e 5 deles perdas compreendidas entre 8 e 20kg.



#### 4.2 Avaliação de variações na concentração em proteína total da saliva

A concentração em proteína total das amostras de saliva mista apresentou alguma variabilidade entre os diferentes indivíduos, estando os valores compreendidos entre 276 e 1692  $\mu\text{g/mL}$ .

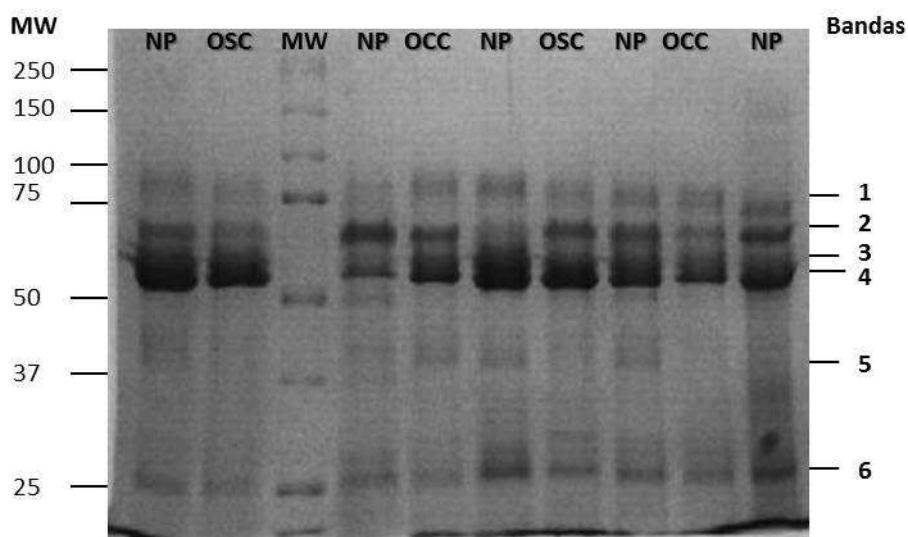
Comparando os valores das concentrações proteicas da saliva dos indivíduos normoponderais com aqueles obtidos para o total de indivíduos obesos (independentemente de terem sido, ou não, submetidos a cirurgia bariátrica) observaram-se valores médios significativamente mais elevados para estes últimos ( $483,1 \pm 44,7$  vs.  $722,0 \pm 73,8$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente; média  $\pm$  erro padrão da média). No entanto, considerando o grupo de indivíduos obesos dividido em submetidos e não submetidos a cirurgia bariátrica, apenas aqueles não submetidos a cirurgia apresentaram concentrações proteicas mais elevadas que os restantes indivíduos (1,7 vezes superior aos valores observados para indivíduos normoponderais) (Figura 5).



**Figura 5 – Concentração de proteína total das amostras de saliva mista (média  $\pm$  erro padrão da média).** NP – indivíduos normoponderais; OCC – indivíduos obesos submetidos a cirurgia bariátrica; OSC – indivíduos obesos não submetidos a cirurgia bariátrica. \* Diferenças significativas entre OSC e NP para  $P < 0,05$ .

#### 4.3 Estudo de alterações no perfil proteico associadas à obesidade

Para avaliar diferenças na composição proteica da saliva mista de indivíduos obesos, submetidos e não submetidos a cirurgia bariátrica, foram comparados os perfis electroforéticos obtidos. Após separação das proteínas de acordo com as suas massas moleculares por SDS PAGE foram observadas 6 bandas proteicas consistentemente presentes nos perfis dos diferentes indivíduos, com massas moleculares aparentes calculadas de 92,2, 74,7, 62,7, 56,8, 40,0 e 20,6 kDa (Figura 6).

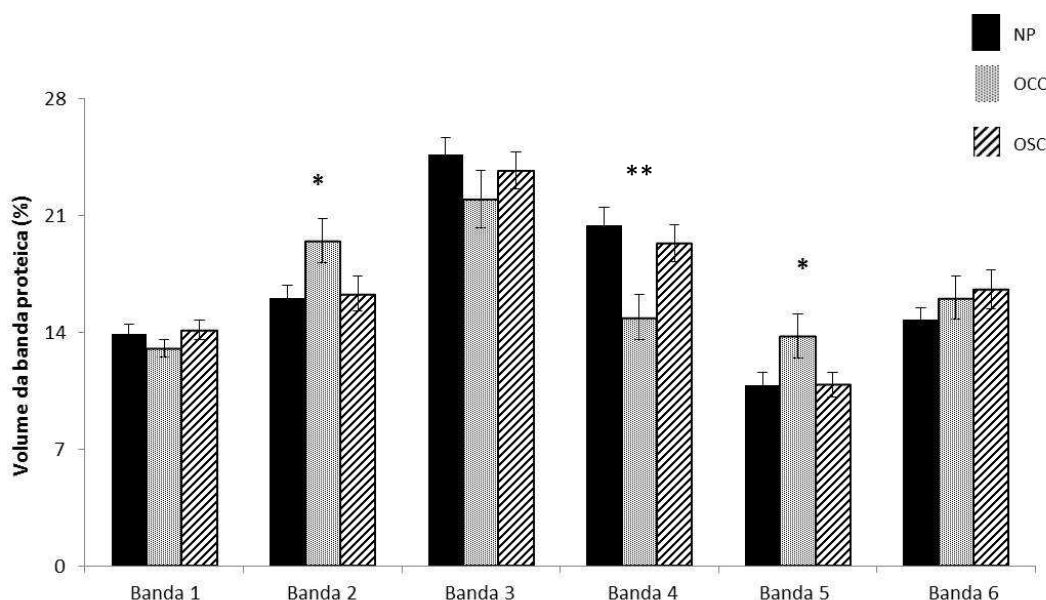


**Figura 6 – Imagem representativa dos perfis proteicos obtidos por separação electroforética uni-dimensional (SDS-PAGE).** São visíveis 6 bandas proteicas em todos os perfis. 1 – 92,2 kDa; 2- 74,7 kDa; 3 – 62,7 kDa; 4 -56,8 kDa; 5 – 40,0 kDa; 6 – 20,6 kDa. NP – indivíduos normoponderais; OCC – indivíduos submetidos a cirurgia bariátrica; OSC – indivíduos não submetidos a cirurgia bariátrica; MW –massas moleculares.

Foram observadas diferenças entre os perfis dos diferentes grupos para a banda 4 (massa molecular aparente calculada de 56,8 kDa), sendo que esta banda apresentou uma expressão menor nos indivíduos obesos submetidos a cirurgia bariátrica, comparativamente aos restantes

grupos ( $20,38\% \pm 1,09\%$ ;  $14,89\% \pm 1,34\%$  e  $19,31\% \pm 1,11\%$ ;  $p < 0,05$  (média  $\pm$  erro padrão da média) para NP, OCC e OSC, respectivamente) (Figura 7).

No caso das bandas 2 (massa molecular aparente calculada de 74,7 kDa) e 5 (massa molecular aparente de 40,0 kDa), observou-se uma tendência para que as mulheres obesas submetidas a cirurgia bariátrica apresentassem uma expressão mais elevada comparativamente aos restantes grupos (banda 2 -  $16,03\% \pm 0,76\%$ ;  $19,48\% \pm 1,33\%$  e  $15,88\% \pm 1,10\%$ ; banda 5 -  $10,80\% \pm 0,76\%$ ;  $13,75\% \pm 1,31\%$  e  $10,84\% \pm 0,73\%$ ;  $0,05 < p < 0,1$  (média  $\pm$  erro padrão da média), para NP, OCC e OSC, respectivamente).



**Figura 7 – Expressão das bandas observadas nos perfis proteicos unidimensionais (SDS PAGE) (média  $\pm$  erro padrão da média).** NP – indivíduos normoponderais; OCC – indivíduos obesos submetidos a cirurgia bariátrica; OSC – indivíduos obesos não submetidos a cirurgia bariátrica. \* Diferenças significativas a  $p < 0,1$ ; \*\* Diferenças significativas a  $p < 0,05$ .

No que diz respeito às bandas 1, 3 e 6 foram observados níveis de expressão médios semelhantes nos três grupos (Figura 7).

Para além da análise de perfis uni-dimensionais, foram ainda analisados os perfis obtidos após separação das proteínas simultaneamente de acordo com a sua carga (pontos isoeléctricos) e massa. Para cada um dos grupos experimentais foram analisados *pools* de saliva, sendo cada *pool* constituído pela saliva de cinco indivíduos diferentes. Com o objectivo de obter um perfil proteico “médio” do grupo em cada *pool*, os volumes utilizados de cada amostra foram calculados de modo a que cada uma contribuísse com a mesma quantidade de proteína total. Cada um dos *pools* foi usado para obtenção de dois géis bi-dimensionais (2 réplicas).

A detecção de *spots* foi feita de forma automática, através do software de análise de géis bi-dimensionais, seguindo-se correcção manual com eliminação e/ou edição daqueles mal detectados. Apenas foram considerados como *spots* constituintes do perfil de cada grupo aqueles que estavam presentes nas duas réplicas analisadas de cada *pool*.

Foram observados 91 *spots* característicos dos perfis dos indivíduos normoponderais, nas zonas de massas moleculares compreendidas entre 15 e 95 kDa (Figura 8 A). A maior concentração de *spots*, os quais se mostraram simultaneamente expressos em maiores níveis, observou-se na zona de massas moleculares compreendidas entre 75 e 50 kDa, de forma semelhante ao que havia sido observado nos géis SDS PAGE. Também nos géis de indivíduos obesos (submetidos e não submetidos a cirurgia bariátrica) os *spots* apresentaram distribuições semelhantes, tendo-se observado um número de 101 para cada um dos grupos (Figura 8 B e C).

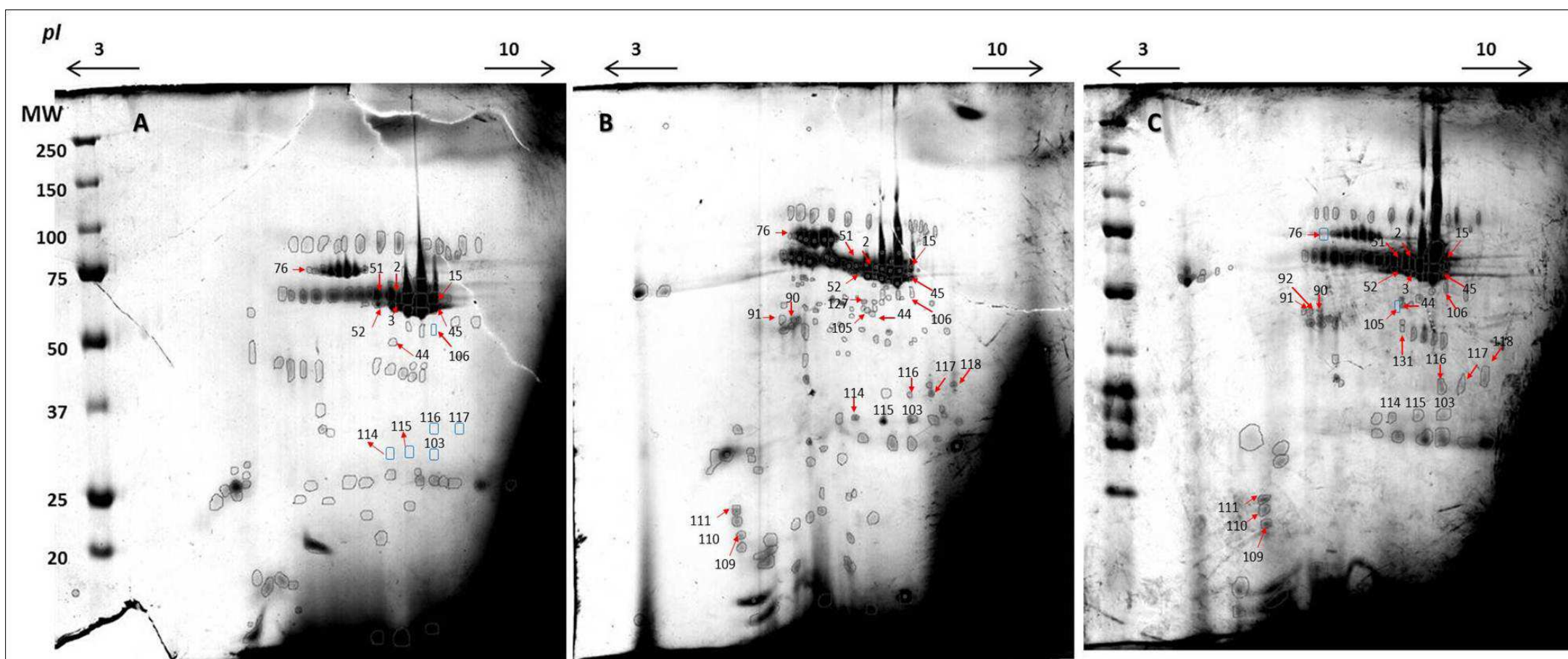
De modo a ter uma percepção da variabilidade inter-individual da expressão de cada proteína (informação que não é possível obter através da análise de *pools*), foram ainda analisados géis individuais de 3 pessoas de cada grupo. Assim, para cada *spot*, os resultados obtidos pela análise dos *pools* (nomeadamente aumentos e diminuições de expressão proteica, assim como

presença ou ausência de *spots* em cada grupo) foi posteriormente confirmado nos géis individuais. *Spots* em que se observasse que um dos indivíduos diferia muito dos restantes, não foram considerados para análise, dada a possibilidade do valor médio ser grandemente influenciado pela existência desse valor extremo.

Foram observadas diferenças entre os grupos experimentais na expressão de diferentes *spots*, as quais são apresentadas na tabela 3. A maior parte das diferenças observadas em relação aos indivíduos normoponderais ocorreu em ambos os grupos de indivíduos obesos. Dois *spots* proteicos apresentaram expressão mais baixa nos perfis correspondentes a estes últimos, comparativamente ao grupo de indivíduos normoponderais e 13 expressão mais elevada em ambos os grupos de obesos. Dos 13 *spots* com expressão mais elevada nos dois grupos de obesos, 8 não foram observados nos géis correspondentes ao *pool* dos indivíduos normoponderais, nem nos géis individuais, enquanto 5 foram observados apenas nos géis individuais, mas também com uma expressão inferior à observada nos 2 grupos de obesos. Por esse motivo não foram considerados valores de percentagem de volumes para esses *spots*.

Para além das alterações comuns aos dois grupos de obesos, o grupo de indivíduos OCC apresentou ainda um *spot* com expressão aumentada e 4 *spots* com expressão diminuída.

Comparando as diferenças observadas nos perfis bi-dimensionais com aquelas já referidas para os perfis obtidos por SDS PAGE, são evidentes as maiores diferenças em zonas de massas moleculares aparentes semelhantes.



**Figura 8 – Imagens representativas dos perfis proteicos bi-dimensionais.** Géis representativos de pools de amostras de indivíduos normoponderais (A), obesos com cirurgia (B) e obesos sem cirurgia (C) - quadrados azuis – *spots* que não estão presentes na imagem apresentada, mas que se encontram nalguns géis (*pool* e individuais) desse grupo. Os spots numerados correspondem àqueles diferencialmente expressos entre os grupos.

**Tabela 3 – Comparação da expressão de *spots* proteicos entre os 3 grupos experimentais (% volume, média  $\pm$  erro padrão)**

Spot	Grupo			MW aparente (kDa) (aproximada)	pI aparente (aproximado)
	Normoponderais (NP)	OCC	OSC		
Expressão diminuída em ambos os grupos de obesos					
3	1,54 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,52 ± 0,22 <sup>b</sup>	57	6,0
45	2,51 ± 0,51 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,74 ± 0,02 <sup>b</sup>	57	6,7
Expressão aumentada em ambos os grupos de obesos					
90	X	0,08	0,19 ± 1,34	45	5,2
91	X	0,16	0,12 ± 0,06	45	5,1
103	---	0,38 ± 0,07	0,41 ± 0,13	25	6,5
105	X	0,10 ± 0,05	0,09 ± 0,006	43	6,0
109	X	0,45 ± 0,20	0,36 ± 0,30	15	4,9
110	X	0,90 ± 0,78	0,41 ± 0,21	18	4,9
111	X	0,70 ± 0,35	0,45 ± 0,18	20	4,9
114	---	0,65 ± 0,69	0,22 ± 0,06	25	6,0
115	---	0,57 ± 0,19	0,26 ± 0,21	25	6,25
116	---	0,15 ± 0,10	0,39 ± 0,27	27	6,5
117	---	0,16 ± 0,03	0,26 ± 0,15	27	6,7
118	X	0,36 ± 0,37	0,35 ± 0,32	27	7,7
127	X	0,12 ± 0,06	0,10 ± 0,007	51	6,0
Expressão diminuída em OCC					
15	1,62 ± 0,73	0,09 ± 0,05	0,28 ± 0,06	67	6,7
51	1,02 ± 0,009	0,39 ± 0,17	1,35 ± 0,40	67	5,5
52	0,68 ± 0,11	0,17 ± 0,08	0,34 ± 0,16	57	5,5
131	0,16 ± 0,03	0,05	0,15 ± 0,02	43	6,0
Expressão aumentada em OSC					
92	X	X	0,07 ± 0,03	45	5,15
Expressão diminuída em OSC					
2	1,65 ± 0,09	0,79 ± 0,32	0,66 ± 0,15	67	6,0
44	0,10 ± 0,002	0,12 ± 0,05	0,05 ± 0,007	45	6,0

X – *spots* que não foram observados em nenhum dos géis (nem nos respeitantes aos *pools*, nem às amostras individuais); --- *spots* cuja presença não foi observada nos géis respeitantes aos *pools*, mas que foram observados em pelo menos um dos géis individuais do grupo correspondente. OCC – indivíduos obesos submetidos a cirurgia bariátrica; OSC – indivíduos obesos não submetidos a cirurgia bariátrica; MW – massas moleculares; pI – ponto isoeléctrico.

No que diz respeito à zona de massas moleculares aparentes 40 – 45 kDa, tinha sido observada uma banda proteica com expressão mais elevada nos géis SDS PAGE dos indivíduos obesos submetidos a cirurgia bariátrica, comparativamente aos não submetidos. Nos perfis bi-dimensionais (Figura 8) também é possível observar uma maior quantidade de *spots*, nessa zona de massas moleculares, para os indivíduos submetidos a cirurgia. Apenas um *spot* (131), com massa molecular aparente de 43 kDa, apresenta uma expressão mais baixa nos géis deste grupo de indivíduos, comparativamente aos restantes grupos.

Dos *spots* proteicos para os quais foi observada diferença na expressão, foi possível identificar 7, com recurso a técnicas de espectrometria de massa (Tabela 4).

**Tabela 4 – Identificação das proteínas presentes em *spots* proteicos diferencialmente expressos entre grupos**

Spot	Identificação
<i>Expressão diminuída em ambos os grupos de obesos</i>	
45	Amilase salivar (AMY1_HUMAN)
<i>Expressão aumentada em ambos os grupos de obesos</i>	
90	Zinco- $\alpha$ -2-glicoproteína (ZA2G_HUMAN)
127	Amilase salivar (AMY1_HUMAN)
<i>Expressão diminuída em OCC</i>	
15	Amilase salivar (AMY1_HUMAN)
51	Albumina do soro (ALBU_HUMAN)
<i>Expressão diminuída em OSC</i>	
2	Amilase salivar (AMY1_HUMAN)
<i>Expressão aumentada em OSC</i>	
92	Zinco- $\alpha$ -2-glicoproteína (ZA2G_HUMAN)



O facto de *spots* diferentes terem sido identificados como correspondendo à mesma proteína mostra a existência de isoformas diferentes, ainda que a metodologia usada não nos permita concluir acerca de quais as diferenças entre essas várias isoformas.

Diferentes isoformas da proteína amilase salivar apresentam variações entre indivíduos normoponderais e indivíduos obesos. Uma das isoformas apresenta expressão diminuída em ambos os grupos de obesos, enquanto uma outra apresenta expressão diminuída especificamente nos indivíduos obesos submetidos a cirurgia e outra especificamente nos indivíduos obesos não submetidos a cirurgia. Existe ainda uma outra isoforma de amilase que apresenta expressão aumentada em ambos os grupos de obesos.

Em ambos os grupos de obesos a expressão da glicoproteína zinco- $\alpha$ -2 está aumentada. Para uma das isoformas observa-se um aumento de expressão em ambos os grupos de obesos, enquanto a outra aparece aumentada apenas nos obesos não submetidos a cirurgia bariátrica.

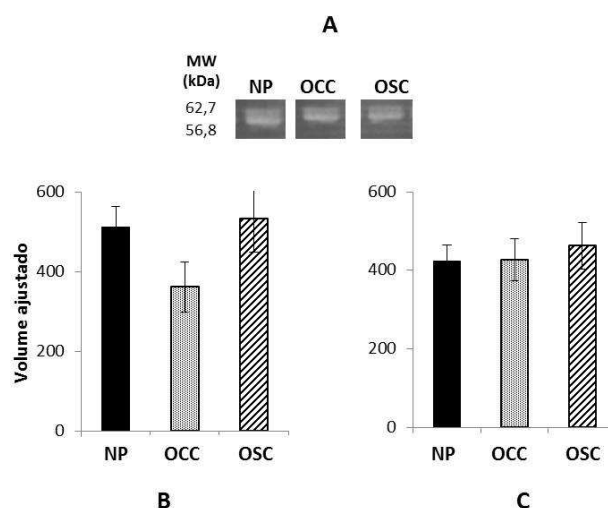
#### 4.4 Análise da expressão da proteína $\alpha$ -amilase salivar

De modo a avaliar a existência de diferenças na expressão de  $\alpha$ -amilase salivar, entre os 3 grupos experimentais, procedeu-se a imunomarcação, por Western Blot, com um anticorpo primário específico para esta proteína. Foram observadas duas bandas com massas moleculares aparentes de 62,7 e 56,8 kDa (Figura 9). Estas bandas correspondem às bandas 3 e 4 observadas nos perfis SDS PAGE, e às massas moleculares aparentes dos *spots* 2, 3, 15, 45, 51 e 52 observados nos perfis 2D (Figura 8).

A imunomarcção foi feita em 5 membranas diferentes, cada uma das quais contendo entre 8 e 9 amostras diferentes, dos vários grupos experimentais.

Para comparar as diferentes amostras foram calculados os volumes ajustados de cada uma das bandas marcadas com o anticorpo. Uma das limitações da análise da expressão das proteínas marcadas por Western Blot em amostras de saliva tem a ver com a inexistência de uma proteína que funcione como marcador interno da quantidade de proteína aplicada. Ou seja, ao contrário do que acontece quando se trabalha com lisados de células, por exemplo, em que há proteínas celulares cujos níveis se mantêm constantes e que permitem aferir diferenças inter-amostras entre a quantidade de proteína aplicada, no caso de fluidos como a saliva, as diferentes proteínas podem variar em proporções diferentes, não se conhecendo nenhuma que se mantenha constante para as diferentes amostras. Assim, para normalizar os valores de volume ajustado das amostras compararam-se as expressões daquelas que foram simultaneamente aplicadas em membranas diferentes, sendo os volumes das mesmas usados para calcular um coeficiente através do qual se ajustaram os valores dos volumes das restantes amostras.

Analisando o total de amostras, não se obtiveram diferenças estatisticamente significativas para nenhuma das bandas marcadas com o anticorpo. No entanto, para a banda de massa molecular aparente de 56,8 kDa observou-se uma tendência para o grupo das mulheres submetidas a cirurgia apresentarem níveis médios de expressão mais baixos que os restantes grupos (Figura 9). Analisando as amostras presentes em cada membrana individual também é possível observar uma tendência para os níveis de expressão da banda de 56,8 kDa serem mais baixos para o grupo de obesos submetidos a cirurgia (Tabela 5).



**Figura 9 – Expressão das bandas marcadas com o anticorpo primário anti-  $\alpha$ -amilase.** A – imagens representativas das marcações observadas nas membranas; B – comparação entre os grupos para a banda com 56,8 kDa de massa molecular aparente; C – comparação entre os grupos para a banda com 62,7 kDa de massa molecular aparente; NP – indivíduos normoponderais; OCC – indivíduos obesos submetidos a cirurgia bariátrica; OSC – indivíduos obesos não submetidos a cirurgia bariátrica.

**Tabela 5 – Análise individual das membranas obtidas por imunomarcação com anticorpo primário anti- $\alpha$ -amilase<sup>1</sup>.**

Banda de 56,8 KDa								
Membrana 1			Membrana 2			Membrana 3		
NP	OCC	OSC	NP	OCC	OSC	NP	OCC	OSC
1144,6	1083,8	1171,2	1893,1	1512,2	1949,5	430,6	439,1	369,7
Membrana 4			Membrana 5					
NP	OCC	OSC	NP	OCC	OSC			
1051,1	500,6	1550,2	857,5	132,9	1058,3			
Banda de 62,7 KDa								
Membrana 1			Membrana 2			Membrana 3		
NP	OCC	OSC	NP	OCC	OSC	NP	OCC	OSC
1134,5	1291,9	1148,3	1555,2	1133,9	1718,9	372,4	544,5	292,8
Membrana 4			Membrana 5					
NP	OCC	OSC	NP	OCC	OSC			
695,8	577,7	1018,8	529,7	430	543,65			

<sup>1</sup>Os valores numéricos correspondem aos volumes ajustados de cada uma das bandas marcadas com anticorpo anti- $\alpha$ -amilase (obtidos através de análise com o software Quantity-One, Bio-Rad) (média de cada grupo em cada uma das membranas individuais). NP – indivíduos normoponderais; OCC – indivíduos obesos submetidos a cirurgia bariátrica; OSC – indivíduos obesos não submetidos a cirurgia bariátrica

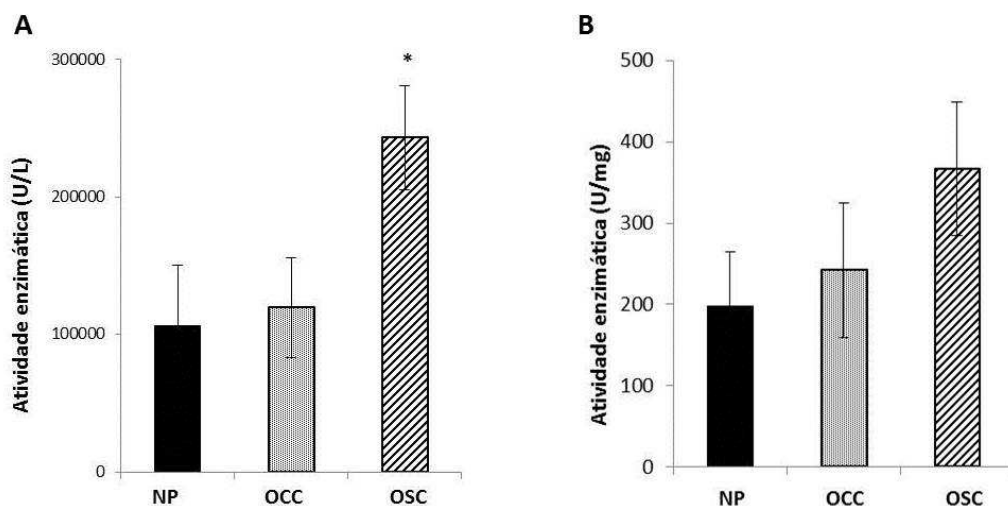
#### 4.5 Avaliação da actividade enzimática de $\alpha$ -amilase salivar

Tendo em conta as diferenças observadas entre os grupos, para a proteína  $\alpha$ -amilase, após a análise dos perfis electroforéticos e da imunomarcação por Western blot, a actividade enzimática desta proteína foi analisada para os diferentes grupos em estudo.

A análise foi feita de dois modos diferentes: tendo em conta a actividade por unidade de volume de saliva (U/L) e tendo em conta a actividade desta enzima relativamente ao total de proteína presente na saliva mista (U/mg) (Figura 10).

É possível observar que os indivíduos obesos não sujeitos a cirurgia apresentam valores médios de actividade enzimática de amilase (U/L saliva) significativamente mais elevados que aqueles apresentados por indivíduos normoponderais e por indivíduos obesos submetidos a cirurgia ( $243,2 \pm 37,7$ ;  $106,1 \pm 44,2$ ; e  $119,5 \pm 36,3$  KU/L (média  $\pm$  erro padrão da média), para OSC, NP e OCC, respectivamente). Estes últimos, por sua vez, não diferem dos indivíduos normoponderais (Figura 10).

No que diz respeito à actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase salivar por unidade de proteína total (U/mg proteína total), as diferenças entre os grupos não são significativas, ainda que em termos médios pareça existir uma tendência para que os indivíduos OSC apresentem valores mais elevados (Figura 10).



**Figura 10 – Actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase salivar (média  $\pm$  erro padrão da média).** A – valores de actividade por litro de saliva; B – valores de actividade enzimática por mg de proteína total da saliva. NP – indivíduos normoponderais; OCC – indivíduos obesos submetidos a cirurgia bariátrica; OSC – indivíduos obesos não submetidos a cirurgia bariátrica. \* Diferenças significativas entre OSC e NP para  $P < 0,05$ .

Alguns dos indivíduos OSC apresentavam alguma perda de peso à data das recolhas (Tabela 2). Analisando apenas este subgrupo de 5 indivíduos, observou-se uma correlação negativa (moderada) entre a quantidade de peso perdido e os valores de actividade enzimática de amilase (U/L) ( $r = -0,38$ ;  $p = 0,00015$ ), ou seja, quando a perda de peso ocorre sem cirurgia bariátrica há uma relação moderada entre a quantidade de peso perdido e os níveis de amilase salivar, havendo uma tendência para que maiores perdas de peso estejam associadas a menores actividades enzimáticas.

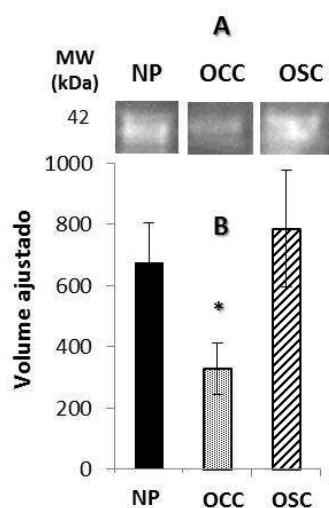
#### 4.6 Análise da expressão da proteína anidrase carbónica VI

Dada a relevância que a proteína salivar anidrase carbónica VI parece apresentar para a sensibilidade gustativa e escolha de alimentos, foi feita a comparação entre os diferentes grupos experimentais, para a sua expressão. Através de Western Blot foi observada a

marcação de uma banda com massa molecular aparente de 42,0 kDa (Figura 11). Ao contrário da  $\alpha$  amilase, com o tipo de coloração utilizada, não foi visualizada nenhuma banda nos perfis SDS PAGE correspondente a esta massa molecular aparente, o que indica que esta proteína seja expressa em quantidades relativamente pequenas, para as quais a coloração usada (*Coomassie Brilliant Blue R-250*) não é suficientemente sensível.

Pela comparação dos diferentes grupos experimentais observou-se uma expressão desta proteína significativamente mais baixa no grupo de mulheres obesas submetidas a cirurgia bariátrica, com estas apresentando valores médios de expressão de cerca de metade dos valores médios obtidos para as mulheres normoponderais (Figura 11). Esta diferença obteve-se por comparação das diversas bandas observadas nas diferentes membranas em conjunto. Os resultados da análise das membranas individuais (à semelhança do que foi apresentado na Tabela 5, para a proteína amilase, encontram-se no Anexo IV).

Para além da comparação entre os grupos, a expressão desta proteína salivar foi ainda correlacionada com o IMC (correlação de Pearson). Tendo em conta a totalidade dos indivíduos estudados (normoponderais e obesos) não se observou uma correlação entre estes dois parâmetros ( $r=0,0054$ ;  $p=0,0054$ ). No entanto, considerando apenas os indivíduos obesos observa-se que, para estes, a expressão de anidrase carbónica VI está positivamente correlacionada com o IMC (correlação moderada a forte;  $R=0,64$ ;  $p=0,037$ ), ou seja, os indivíduos de maior IMC apresentam tendencialmente maior expressão de anidrase carbónica VI na saliva mista.



**Figura 11 - Expressão das bandas marcadas com o anticorpo primário anti-anidrase carbônica VI (média  $\pm$  erro padrão da média).** A – imagens representativas das marcações observadas nas membranas; B – comparação entre os grupos; NP – indivíduos normoponderais; OCC – indivíduos obesos submetidos a cirurgia bariátrica; OSC – indivíduos obesos não submetidos a cirurgia bariátrica. \* diferenças significativas entre OCC e restantes grupos, para  $P < 0,05$ .





# Discussão



## 5. Discussão

Nos últimos anos, o interesse no estudo do proteoma salivar em diversas patologias tem vindo a crescer, principalmente para pesquisa de biomarcadores que permitam o diagnóstico precoce de uma forma rápida e não invasiva. No caso da obesidade a composição proteica da saliva está ainda pouco estudada. No que diz respeito à pesquisa de biomarcadores de diagnóstico, isso poderá ser facilmente compreensível dada a facilidade em identificar esta condição através de características antropométricas. Por outro lado, o facto da obesidade ser uma condição de etiologia complexa, com contribuição de factores genéticos e ambientais para o seu desenvolvimento, pode resultar na existência de diferentes variáveis responsáveis por alterações na expressão proteica da saliva, tornando difícil encontrar marcadores “universais” de obesidade. No entanto, potenciais alterações no proteoma salivar decorrentes desta condição poderão servir de indicadores de alterações fisiológicas, ajudando a compreender esta patologia e, nesse sentido, o estudo da função salivar na obesidade poderá ser de grande interesse. É ainda de realçar que as características do meio oral, para as quais a composição da saliva contribui, têm um papel de relevo nas escolhas alimentares, as quais, na maior parte dos casos, constituem um dos principais factores para o ganho de peso e alterações metabólicas.

Tendo em conta a diversidade de factores que afecta a secreção e composição da saliva, entre os quais o género e a idade <sup>[18, 90]</sup>, neste trabalho avaliaram-se apenas mulheres, havendo o cuidado de ter o mesmo intervalo de idades para os diferentes grupos em estudo.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que mulheres com obesidade mórbida apresentam uma saliva mista com composição diferente da de mulheres

normoponderais e que muitas vezes essa composição é ainda diferente após perda de peso induzida por cirurgia bariátrica [gastrectomia vertical (*sleeve*)].

Uma das diferenças observadas entre os grupos foi em termos de concentração em proteína total da saliva mista, a qual se observou significativamente mais elevada nas mulheres obesas que não haviam sido submetidas a cirurgia. Aumentos na concentração proteica da saliva de crianças e adolescentes obesos foram referidos por outros autores [76]. O aumento da concentração em proteína total pode resultar de uma diminuição da quantidade de água excretada na saliva. Assim, a mesma quantidade de proteína em indivíduos com menor taxa de secreção salivar poderá resultar numa saliva com maior concentração proteica. Apesar desse parâmetro não ter sido avaliado no presente trabalho, diminuições da taxa de secreção salivar em obesos foram referidas por alguns autores para crianças e adolescentes [70, 76]. Adicionalmente, o aumento da concentração proteica da saliva já foi observado noutras patologias frequentemente associadas à obesidade. No caso da diabetes, vários estudos mostraram a existência de hipofunção salivar, traduzida numa redução do volume de saliva produzido [46, 53, 64]. Um estudo recente refere também alterações na secreção salivar em mulheres com síndrome metabólico [105].

Um dos principais resultados do presente estudo é a observação de alterações nos proteomas salivares de indivíduos obesos. Mais interessante ainda é o facto dessas alterações serem diferentes consoante os indivíduos estejam, ou não, em processo de perda de peso induzida por cirurgia bariátrica. Através da análise dos perfis obtidos por SDS PAGE foi possível observar que as mulheres obesas depois de submetidas a cirurgia bariátrica apresentam uma tendência para uma maior expressão de 2 bandas proteicas com massas moleculares aparentes de 74,7 e 40,0 kDa (diferenças significativas para um intervalo de confiança de 90%), expressão essa que não se

encontra alterada em mulheres obesas não submetidas a este tipo de cirurgia. Os géis bi-dimensionais correspondentes ao grupo de mulheres obesas submetidas a cirurgia mostram que na zona de massas moleculares aparentes de 40-45 kDa há uma maior expressão de diversos *spots* proteicos, comparativamente aos restantes grupos, sugerindo que as proteínas presentes nesses *spots* possam contribuir para a expressão aumentada da banda correspondente no perfil SDS PAGE. Dos diversos *spots* proteicos presentes nessa zona de massas moleculares, apenas foi possível identificar 2, ambos correspondentes à zinco- $\alpha$ -2-glicoproteína, em que um deles apresentava maior expressão em ambos os grupos de obesos, enquanto o outro só estava aumentado nos indivíduos obesos não submetidos a cirurgia. Esta é uma proteína com interesse no metabolismo energético, dado o seu envolvimento na mobilização e utilização de lípidos armazenados <sup>[39]</sup>. Alguns autores relacionaram os níveis séricos desta proteína com o IMC, tendo observado níveis significativamente mais elevados em indivíduos obesos <sup>[114]</sup>. É possível que a maior expressão desta proteína na saliva de indivíduos obesos, que observámos no presente estudo, se deva à sua maior presença no sangue. O facto de existir uma isoforma que está aumentada apenas nas mulheres obesas não submetidas a cirurgia poderá ter a ver com os seus IMC mais elevados. No entanto, são necessários estudos complementares que ajudem a elucidar o papel destas diferentes isoformas e, consequentemente, o significado desta diferente expressão.

Para a zona de massas moleculares próximas de 74 kDa não foi possível observar *spots* consistentemente alterados entre os grupos, apesar dos resultados obtidos através de observação dos perfis SDS PAGE. Uma das possibilidades é essa banda ser constituída por proteínas com pontos isoelectrónicos muito próximos dos limites ácidos ou básicos, não se conseguindo resolver na gama de pH usada nestes géis. De qualquer modo, são

importantes estudos futuros que permitam identificar as proteínas presentes nesta região.

A banda correspondente a uma massa molecular aparente de 56,8 kDa, observada nos perfis SDS PAGE, apresentou uma expressão significativamente mais baixa na saliva de mulheres obesas submetidas a cirurgia comparativamente aos restantes grupos. Através de imunomarcação pela técnica de Western Blot, foi possível observar que esta banda contém a proteína  $\alpha$ -amilase salivar. Ainda que as diferenças na intensidade de marcação com o anticorpo, entre os três grupos experimentais, não tenham sido significativas, observou-se uma tendência para esta ser menor nas amostras correspondentes aos indivíduos submetidos a cirurgia, em concordância com os resultados obtidos por SDS PAGE. Um dos motivos para a falta de significância estatística poderá ter a ver com as limitações da aplicação da técnica de Western Blot a amostras de saliva, uma vez que não se conhece uma proteína salivar que possa ser utilizada como marcador interno das quantidades de amostra aplicadas (ou seja, não é conhecida nenhuma proteína salivar que, independentemente das condições, se mantenha sempre com uma concentração constante em todas as amostras), o que dificulta a comparação entre amostras presentes em membranas diferentes.

A relação entre a expressão de  $\alpha$ -amilase salivar e as escolhas de alimentos tem ganho destaque através de estudos que mostram uma relação dos níveis desta proteína com o tipo de dieta habitualmente consumida <sup>[79]</sup> ou com os níveis de saciedade percebida <sup>[41]</sup>. Há ainda estudos que sugerem uma regulação directa da secreção desta proteína pelo gosto <sup>[16]</sup>. Estes factos reforçam o potencial desta proteína salivar na obesidade, apesar do reduzido número de estudos presente na bibliografia. Um estudo realizado em crianças refere níveis de  $\alpha$ -amilase salivar mais elevados apenas em rapazes obesos,

comparativamente a crianças normoponderais, não sendo as mesmas diferenças observadas em raparigas <sup>[21]</sup>.

A proteína  $\alpha$ -amilase salivar tem como principal função a degradação de amido em maltose, triose e oligossacáridos. Esta primeira digestão, a nível da boca, tem efeito na percepção dos alimentos, uma vez que a  $\alpha$ -amilase altera as propriedades físicas do amido <sup>[31, 63]</sup>, podendo ter também influência directa a nível do gosto <sup>[85]</sup>. Tendo em conta essas evidências, podemos sugerir que níveis de  $\alpha$ -amilase salivar mais baixos nos indivíduos obesos submetidos a cirurgia bariátrica possam influenciar a percepção que estes têm do gosto doce e, consequentemente, as suas escolhas alimentares. Diversos autores sugerem que indivíduos com menor sensibilidade para o gosto doce (ou seja, que necessitam de concentrações mais elevadas deste para o perceberem) procuram alimentos com maiores níveis deste gosto e, consequentemente, mais calóricos <sup>[61]</sup>. Há, no entanto, alguma controvérsia, uma vez que alguns autores referem que crianças obesas apresentam limiares de detecção para o gosto doce mais baixos (ou seja, têm a capacidade de perceber este gosto em concentrações baixas) que os de crianças normoponderais <sup>[25]</sup>.

Alguns estudos mostram que após cirurgia bariátrica os indivíduos diminuem a sua preferência por alimentos doces <sup>[69]</sup>. Apesar dessa relação não ter sido sugerida por estes autores, essa menor preferência pode estar associada a uma sensibilidade aumentada para este gosto. De facto, em indivíduos submetidos a cirurgia bariátrica de *by-pass* gástrico observou-se uma diminuição no limiar de detecção para o gosto doce, ou seja, um aumento de sensibilidade para concentrações baixas deste estímulo <sup>[10]</sup>. Tendo em conta que uma estimulação constante dos receptores gustativos pode aumentar os limiares de detecção dos gostos que lhes estão associados, ou seja, pode conduzir à necessidade de maiores concentrações de um estímulo para que este seja percebido <sup>[66]</sup>,

é possível especular que níveis mais baixos de  $\alpha$ -amilase salivar nos indivíduos submetidos a cirurgia signifiquem menores níveis de açúcares livres na sequência da mastigação de alimentos amiláceos. Por sua vez, isto representaria uma menor estimulação constante dos receptores gustativos, contribuindo para um aumento da sensibilidade ao gosto doce. Se assim for, é possível pensar que esses indivíduos consigam o mesmo valor de “recompensa” com níveis de doce mais baixos.

Os perfis proteicos bi-dimensionais também mostraram existirem diminuições na expressão de alguns *spots* proteicos situados nas zonas de massas moleculares próximas de 57 kDa. Através da utilização de técnicas de espectrometria de massa foi possível identificar a proteína  $\alpha$ -amilase salivar como estando presente num desses *spots*, o qual tinha uma expressão diminuída em ambos os grupos de obesos (*spot* 45). Para além deste, a proteína  $\alpha$ -amilase salivar foi ainda identificada num outro *spot* de expressão diminuída apenas no grupo de obesos submetidos a cirurgia, com uma massa molecular aparente de 67 kDa (*spot* 15).

Em mulheres obesas não sujeitas a cirurgia também foram observadas diferenças a nível de *spots* identificados como  $\alpha$ -amilase salivar. Para além da diminuição já referida numa isoforma de 57 kDa (*spot* 45), uma outra isoforma, de 67 kDa (*spot* 2), apresentou uma expressão diminuída apenas nestes indivíduos, o que indica que algumas diferenças a nível da proteína  $\alpha$ -amilase salivar poderão ser específicas consoante a existência, ou não, de perda de peso. Uma vez que diferentes isoformas proteicas podem apresentar diferenças em termos de funcionalidade, um maior conhecimento acerca das diferenças entre elas poderá ser de grande utilidade na compreensão das alterações envolvidas nesta patologia. Há, no entanto que ter em atenção que, no presente trabalho apenas a perda de peso induzida por cirurgia bariátrica foi comparada com a inexistência (ou existência reduzida) de perda de peso. Por esse motivo não nos é possível distinguir as



alterações resultantes especificamente de um processo de perda de peso ou do tipo de cirurgia. Futuros estudos que comparem a saliva de indivíduos obesos submetidos a perdas de peso induzidas de formas diferentes poderão ajudar a elucidar este ponto.

Apesar da expressão de  $\alpha$ -amilase salivar, nas mulheres obesas não submetidas a cirurgia, não ter sido observada alterada nem através da análise dos perfis SDS PAGE, nem nas membranas marcadas por Western Blot, foi observado um aumento da actividade enzimática desta proteína (U/L), neste grupo de indivíduos. A inexistência de uma maior expressão da banda correspondente à  $\alpha$ -amilase salivar nos perfis proteicos de mulheres obesas não submetidas a cirurgia pode ter a ver com o facto de, nestes perfis, a expressão de cada banda proteica ser um valor relativo da quantidade de proteína total aplicada. Esta possibilidade é reforçada pelo facto da actividade enzimática por unidade de proteína total (U/mg) também não diferir entre os grupos. A maior actividade enzimática que se observa por volume de saliva (U/L) poderá ser resultado das mulheres obesas não submetidas a cirurgia apresentarem uma saliva mista com uma concentração em proteína total significativamente mais elevada. Caso a taxa de secreção salivar (mL/minuto) se mantenha semelhante em todos os grupos experimentais, então é de pensar que o total de actividade enzimática desta proteína, na boca, por unidade de tempo, seja maior em mulheres obesas não submetidas a cirurgia. E se assim for, esta diferença poderá ter significado biológico. Uma maior actividade enzimática de  $\alpha$ -amilase salivar significaria uma maior degradação de amido, com maiores níveis de compostos doces constantemente presentes na boca, à semelhança do que foi discutido anteriormente. Nesse sentido, poder-se-á colocar a hipótese de uma menor sensibilidade ao gosto doce, com uma consequente necessidade de concentrações mais elevadas de substâncias doces para o mesmo nível de percepção e “prazer”, tal como foi já sugerido por outros autores para indivíduos obesos <sup>[113]</sup>.

Para além do que foi referido, há ainda a hipótese da actividade enzimática desta proteína não reflectir exactamente a quantidade de  $\alpha$ -amilase presente na saliva, uma vez que a actividade enzimática desta proteína depende das condições do meio, como pH e concentração de iões cálcio <sup>[71]</sup>. Assim, não é de excluir que diferenças entre os resultados obtidos para a actividade enzimática e os resultados obtidos através da análise dos perfis proteicos e imunomarcacão se possam dever a diferenças na composição electrolítica da saliva, as quais será interessante explorar em estudos futuros.

Para além do papel, até agora referido, da proteína  $\alpha$ -amilase salivar na digestão inicial dos hidratos de carbono, esta proteína salivar foi mais recentemente apontada como potencial marcador de *stress* e da actividade do ramo simpático do sistema nervoso autónomo <sup>[73]</sup>. Ainda que alguns autores apontem limitações à utilização da  $\alpha$ -amilase salivar como indicador de actividade deste ramo do sistema nervoso <sup>[8]</sup>, a verdade é que em situações em que a actividade do sistema nervoso simpático esteja aumentada, há um aumento da síntese e secreção desta proteína salivar <sup>[35]</sup>. Há estudos que referem que a obesidade está associada a um aumento da actividade do sistema nervoso simpático para vários órgãos <sup>[38, 107]</sup>, apesar do conhecimento de que o “fluxo” simpático é altamente diferenciado e pode não apresentar uma magnitude semelhante para os restantes órgãos <sup>[17]</sup>. Por exemplo, há autores que referem que o ganho de peso induzido por um consumo alimentar aumentado conduz a aumentos da actividade simpática na musculatura <sup>[43]</sup> e que a perda de peso conduz a diminuições dessa actividade <sup>[97]</sup>. Assim, as diferenças observadas em termos de actividade de  $\alpha$ -amilase salivar podem estar relacionadas com um aumento de actividade deste ramo do sistema nervoso autónomo, em indivíduos obesos não submetidos a cirurgia e a uma diminuição da actividade deste com a perda de peso, nos indivíduos submetidos a cirurgia bariátrica.

Para estes últimos, diminuições na actividade do sistema nervoso autónomo foram já referidas <sup>[97]</sup>.

No presente trabalho, através de imunomarcação por Western Blot, foram observadas diferenças nos níveis de anidrase carbónica VI. Esta proteína apresentou-se menos expressa nas mulheres obesas submetidas a cirurgia bariátrica, comparativamente aos restantes grupos. A banda de massa molecular aparente de 42 kDa não foi visualizada nos géis SDS-PAGE, através do método de coloração utilizado. No entanto, nos perfis bi-dimensionais, um *spot* de massa molecular de 43 kDa apresentou uma expressão diminuída para o grupo de mulheres obesas não submetidas a cirurgia. Apesar da identificação da proteína correspondente, por espectrometria de massa, ter falhado (possivelmente devido a quantidade insuficiente de proteína para identificação), há a hipótese desse *spot* poder corresponder a esta proteína. A anidrase carbónica VI é uma proteína produzida maioritariamente pelas células acinares serosas das glândulas parótidas e pelas células acinares serosas das glândulas linguais de von Ebner e tem sido referida como associada à percepção do gosto <sup>[39]</sup>. Alguns estudos referem uma associação da expressão, e/ou actividade, desta proteína à sensibilidade para o gosto do composto amargo PROP <sup>[11, 12]</sup>. Foi observado que indivíduos com polimorfismos para esta proteína, associados a uma diminuição da sua actividade, apresentam menores sensibilidades para o PROP <sup>[12]</sup>. A menor expressão apresentada pelas mulheres obesas submetidas a cirurgia poderá levar a que estas tenham menor sensibilidade para o gosto amargo. Tendo em conta a relação apontada por alguns autores entre a sensibilidade para o amargo e o consumo de alimentos saudáveis, como vegetais <sup>[22]</sup>, é possível especular que menor sensibilidade para o gosto amargo possa resultar numa maior aceitação desses alimentos e que isso vá ajudar a escolhas de dietas mais saudáveis (ou pelo menos a uma maior aceitação destes). De facto há estudos que sugerem a

possibilidade de alterações na sensibilidade gustativa induzidas por cirurgia bariátrica [88].

A correlação observada no presente trabalho, entre o IMC de mulheres obesas não sujeitas a cirurgia e a expressão de anidrase carbônica VI, aponta no sentido de mulheres obesas com IMC mais elevado serem mais sensíveis ao gosto amargo. Essa maior sensibilidade poderia limitar a tolerância de alimentos com compostos amargos, influenciando escolhas alimentares e resultando no consumo de alimentos mais calóricos. Vários estudos têm tentado compreender a relação entre a percepção do gosto e o IMC, mas há resultados contraditórios. Há autores que referem uma diminuição significativa na percepção do gosto amargo em indivíduos com IMC superiores a 28 [93]. Também autores como Goldstein et al. [36] ou Tepper [101] referem que indivíduos menos sensíveis são os que apresentam IMC elevados. No entanto, noutros estudos os resultados sugerem a não existência de relação entre a sensibilidade para este gosto básico e o IMC [27, 48].

## **Conclusões**



## 6. Conclusões

Com o objectivo principal de avaliar alterações na composição proteica da saliva decorrentes da obesidade, que pudessem contribuir para a compreensão das escolhas alimentares nessa condição, estudaram-se dois grupos de mulheres obesas das consultas de obesidade do Hospital de Santa Maria, as quais foram comparadas com mulheres normoponderais da mesma faixa etária e seleccionadas aleatoriamente. A comparação entre mulheres obesas submetidas e não submetidas a cirurgia bariátrica deveu-se às observações clínicas de que as preferências alimentares se alteram com este tipo de cirurgia.

Foi possível verificar que a composição proteica da saliva difere em mulheres obesas, comparativamente a normoponderais, e que a perda de peso induzida pela cirurgia bariátrica resulta em alterações particulares. Duas das proteínas específicas da saliva e cuja participação no processo de percepção dos alimentos tem sido referido, são a  $\alpha$ -amilase salivar e a anidrase carbónica VI. Verificou-se que estas proteínas são diferencialmente expressas entre mulheres normoponderais e obesas, e que a sua expressão é também influenciada pela existência, ou não, de perda de peso induzida por cirurgia bariátrica. As mulheres submetidas a cirurgia apresentam níveis mais baixos de ambas as proteínas. É possível que a menor existência destas proteínas salivares contribua para uma diferente sensibilidade gustativa, a qual resulte numa diminuição das preferências por alimentos calóricos. Um outro resultado interessante deste estudo é a correlação que existe entre os níveis expressos de proteína anidrase carbónica VI e o índice de massa corporal, com aumentos na expressão desta proteína em indivíduos com IMCs mais elevados. Esta correlação já não se observa em indivíduos normoponderais, o que sugere que esta proteína pode ter um papel particularmente importante nas

características do meio oral de indivíduos obesos, e que contribua para as suas escolhas alimentares. O facto desta proteína ser referida em vários estudos como estando relacionada com a sensibilidade gustativa em geral, e em particular com a percepção do gosto amargo, torna particularmente relevante a existência de estudos futuros que ajudem a compreender o seu papel na escolha de alimentos por parte de indivíduos obesos.

Um outro resultado relevante, obtido no presente trabalho, é a observação de que, para além das referidas, há outras proteínas salivares cuja expressão está alterada em mulheres obesas submetidas e não submetidas a cirurgia bariátrica. A zinco- $\alpha$ -2-glicoproteína apresentou-se com uma expressão aumentada na saliva de mulheres obesas, comparativamente às normoponderais. Uma das isoformas apareceu mesmo diferencialmente expressa entre os dois grupos de mulheres obesas. Dado o papel descrito desta proteína na lipólise, estudos futuros que permitam elucidar o papel desta proteína na saliva destes indivíduos são de interesse.

Que seja do nosso conhecimento, este trabalho descreve pela primeira vez alterações na saliva de obesos submetidos e não submetidos a cirurgia bariátrica. No presente trabalho não foi feita a avaliação da sensibilidade gustativa das mulheres estudadas. Esse será um ponto importante a estudar em trabalhos futuros, de modo a atestar se estas alterações salivares observadas estão realmente associadas a diferentes percepções de alimentos, e quais as sensações orais afectadas por elas. Um outro ponto que deverá merecer atenção no futuro, é se estas alterações também se observam em homens obesos, ou se o tipo de alteração está especificamente associado ao género.

Uma maior compreensão das características do meio oral poderá contribuir para um melhor entendimento das escolhas alimentares e permitir intervenções a nível dietético



que se adequem às preferências alimentares individuais, com maiores probabilidades de sucesso.



# **Bibliografia**



## 7. Bibliografia

1. Aps J, Martens L. 2005. The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int.* 150: 119–131.
2. Aras HÇ, Ekström J. 2006. Cholecystokinin- and gastrin-induced protein and amylase secretion from the parotid glands of the anaesthetized rat. *Regul Pept.* 134: 89-96.
3. Bartoshuk LM, Duffy VB, Hayes JE, Moskowitz HR, Snyder DJ. 2006. Psychophysics of sweet and fat perception in obesity: problems, solutions and new perspectives. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361: 1137-1148.
4. Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR. 2003. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med.* 349: 941-948.
5. Berthoud HR, Morrison C. 2008. The brain, appetite, and obesity. *Annu Rev Psychol.* 59: 55-92.
6. Blouet C, Schwartz GJ. 2010. Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav Brain Res.* 209: 1-12.
7. Bohlender J, Rauh M, Zenk J, Gröschl M. 2003. Differential distribution and expression of leptin and the functional leptin receptor in major salivary glands of humans. *J. Endocrinol.* 178: 217-223.
8. Bosch JA, Veerman EC, de Geus EJ, Proctor GB. 2011.  $\alpha$ -Amylase as a reliable and convenient measure of sympathetic activity: don't start salivating just yet! *Psychoneuroendocrinology.* 36: 449-453.
9. Brinckerhoff TZ, Bondada S, Lewis CE, French SW, Deugarte DA. 2013. Metabolic effects of sleeve gastrectomy in female rat model of diet-induced obesity. *Surg Obes Relat Dis.* 9: 108-1012.

10. Bueter M, Miras AD, Chichger H, Fenske W, Ghatei MA, Bloom SR, Unwin RJ, Lutz TA, Spector AC, le Roux CW. 2011. Alterations of sucrose preference after Roux-en-Y gastric bypass. *Physiol Behav.* 104: 709–721.
11. Cabras T, Melis M, Castagnola M, Padiglia A, Tepper BJ, Messana I, Tomassini Barbarossa I. 2012. Responsiveness to 6-n-propylthiouracil (PROP) is associated with salivary levels of two specific basic proline-rich proteins in humans. *PLoS One.* 7:e30962.
12. Calò C, Padiglia A, Zonza A, Corrias L, Contu P, Tepper BJ, Barbarossa IT. 2011. Polymorphisms in TAS2R38 and the taste bud trophic factor, gustin gene co-operate in modulating PROP taste phenotype. *Physiol Behav.* 104: 1065-1071.
13. Caseiro A, Vitorino R, Barros AS, Ferreira R, Calheiros-Lobo MJ, Carvalho D, Duarte JA, Amado F. 2012. Salivary peptidome in type 1 diabetes mellitus. *Biomed Chromatogr.* 26: 571-582.
14. Catalán MA, Nakamoto T, Melvin JE. 2009. The salivary gland fluid secretion mechanism. *J Med Invest.* 56 Suppl: 192-196.
15. Chen J, Pamuklar Z, Spagnoli A, Torquati A. 2012. Serum leptin levels are inversely correlated with omental gene expression of adiponectin and markedly decreased after gastric bypass surgery. *Surg Endosc.* 26: 1476-1480.
16. Dasso M, Pagotto R, Pignataro OP, Diez RA, Sales ME. 2011. Effect of bitter compounds on amylase secretion in murine submandibular glands: Signaling pathway mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 1810:1212-1219.
17. Davy KP, Orr JS. 2009. Sympathetic nervous system behavior in human obesity. *Neurosci Biobehav Rev.* 33: 116-124.
18. Dawes C. 1984. Stimulus effects on protein and electrolyte concentrations in parotid saliva. *J Physiol.* 346: 579-588.

19. De Jonghe BC, Hajnal A, Covasa M. 2005. Increased oral and decreased intestinal sensitivity to sucrose in obese, prediabetic CCK-A receptor-deficient OLETF rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288: R292-R300.
20. De Matteis R, Puxeddu R, Riva A, Cinti S. 2002. Intralobular ducts of human major salivary glands contain leptin and its receptor. *J Anat.* 201: 363-370.
21. de Oliveira CG, Collares EF, Barbieri MA, Fernandes MI. 1997. Production and concentration of saliva and salivary amylase in obese children. *Arq Gastroenterol.* 34: 105-111.
22. Dinehart ME, Hayes JE, Bartoshuk LM, Lanier SL, Duffy VB. 2006. Bitter taste markers explain variability in vegetable sweetness, bitterness, and intake. *Physiol Behav.* 87: 304-313.
23. Direcção-Geral da Saúde. Divisão de Doenças Genéticas, Crónicas e Geriátricas Programa Nacional de Combate à Obesidade. Lisboa, Portugal DGS, 2005. 24 p.
24. do Carmo I, Dos Santos O, Camolas J, Vieira J, Carreira M, Medina L, Reis L, Myatt J, Galvão-Teles A. 2008. Overweight and obesity in Portugal: national prevalence in 2003-2005. *Obes Rev.* 9: 11-19.
25. Donaldson LF, Bennett L, Baic S, Melichar JK. 2009. Taste and weight: is there a link? 90: 800S-803S.
26. Drewnowski A, Brunzell JD, Sande K, Iverius PH, Greenwood MR. 1985. Sweet tooth reconsidered: taste responsiveness in human obesity. *Physiol Behav.* 35: 617-622.
27. Drewnowski A, Henderson SA, Cockcroft JE. 2007. Genetic sensitivity to 6-n-propylthiouracil has no influence on dietary patterns, body mass indexes, or plasma lipid profiles of women. *J Am Diet Assoc.* 107: 1340–1348.

28. Dsamou M, Palicki O, Septier C, Chabanet C, Lucchi G, Ducoroy P, Chagnon MC, Morzel M. 2012. Salivary protein profiles and sensitivity to the bitter taste of caffeine. *Chem Senses*. 37: 87-95.
29. Duca FA, Covasa M. 2012. Current and emerging concepts on the role of peripheral signals in the control of food intake and development of obesity. *Br J Nutr*. 108: 778-793.
30. Ekström J, Aras HC. 2008. Parasympathetic non-adrenergic, non-cholinergic transmission in rat parotid glands: effects of cholecystokinin-A and -B receptor antagonists on the secretory response. *Regul Pept*. 146: 278-284.
31. Engelen L, van den Keybus PA, de Wijk RA, Veerman EC, Amerongen AV, Bosman F, Prinz JF, van der Bilt A. 2007. The effect of saliva composition on texture perception of semi-solids. *Arch Oral Biol*. 52: 518-525.
32. Epstein LH, Paluch R, Coleman KJ. 1996. Differences in salivation to repeated food cues in obese and nonobese women. *Psychosom Med*. 58: 160-164.
33. Feldstein J B, Silverman DN 1984. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. *J Biol Chem*. 259: 5447-5453.
34. Gagner M, Gumbs AA, Milone L, Yung E, Goldenberg L, Pomp A. 2008. Laparoscopic sleeve gastrectomy for the super-super-obese (body mass index >60 kg/m<sup>2</sup>). *Surg Today*. 38: 399-403.
35. Garrett JR. The proper role of nerves in salivary secretion: a review. 1987. *J Dent Res*. 66: 387-397.
36. Goldstein GL, Daun H, Tepper BJ. 2005. Adiposity in middle-aged women is associated with genetic taste blindness to 6-n-propylthiouracil. *Obes Res* 13: 1017–1023.



37. Grassi G, Seravalle G, Cattaneo BM, Bolla GB, Lanfranchi A, Colombo M, Giannattasio C, Brunani A, Cavagnini F, Mancia G. 1995. Sympathetic activation in obese normotensive subjects. *Hypertension*. 25: 560-563.
38. Hassan MI, Waheed A, Yadav S, Singh TP, Ahmad F. 2008. Zinc alpha 2-glycoprotein: a multidisciplinary protein. *Mol Cancer Res*. 6: 892-906.
39. Henkin RI, Martin BM, Agarwal RP. 1999. Decreased parotid saliva gustin/carbonic anhydrase VI secretion: an enzyme disorder manifested by gustatory and olfactory dysfunction. *Am J Med Sci*. 318: 380-391.
40. Hajnal A, Kovacs P, Ahmed T, Meirelles K, Lynch CJ, Cooney RN. 2010. Gastric bypass surgery alters behavioral and neural taste functions for sweet taste in obese rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 299: G967–G979.
41. Harthoorn LF, Schipper RG, Loof A, Vereijken PFG, Van Heerde WL, Dransfield E. 2007. Salivary biomarkers associated with perceived satiety and body mass in humans. *Proteomics Clin Appl*. 1: 1637-1650.
42. Herness S, Zhao FL. 2009. The neuropeptides CCK and NPY and the changing view of cell-to-cell communication in the taste bud. *Physiol Behav*. 97: 581-591.
43. Huggett RJ, Scott EM, Gilbey SG, Bannister J, Mackintosh AF, Mary DA. 2005. Disparity of autonomic control in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 48: 172–179.
44. Hurtado MD, Acosta A, Riveros PP, Baum BJ, Ukhanov K, Brwon AR, Dotson CD, Herzog H, Zolotukhin S. 2012. Distribution of Y-receptors in murine lingual epithelia. *PLoS ONE* 7: e46358.
45. Iwabuchi Y, Masuhara T. 1995. Effects of vasoactive intestinal peptide and its homologues on the acetylcholine-mediated secretion of fluid and protein from the rat submandibular gland. *Gen. Pharmacol*. 26: 961-970.

46. Jawed M, Shahid SM, Qader SA, Azhar A. 2011. Dental caries in diabetes mellitus: role of salivary flow rate and minerals. *J Diabetes Complications*. 25: 183-186.
47. Kadoya Y, Kuwahara H, Shimazaki M, Ogawa Y, Yagi T. 1987. Isolation of a novel carbonic anhydrase from human saliva and immunohistochemical demonstration of its related isozymes in salivary gland. *Osaka City Med J*. 33: 99-109.
48. Kaminski LC, Henderson SA, Drewnowski A. 2000. Young women's food preferences and taste responsiveness to 6-n-propylthiouracil (PROP). *Physiol Behav*. 68: 691–697.
49. Kanoski SE, Fortin SM, Arnold M, Grill HJ, Hayes MR. 2011. Peripheral and central GLP-1 receptor populations mediate the anorectic effects of peripherally administered GLP-1 receptor agonists, liraglutide and exendin-4. *Endocrinology*. 152: 3103-3112.
50. Keller KL, Liang LC, Sakimura J, May D, van Belle C, Breen C, Driggin E, Tepper BJ, Lanzano PC, Deng L, Chung WK. 2012. Common variants in the CD36 gene are associated with oral fat perception, fat preferences, and obesity in African Americans. *Obesity* 20: 1066-1073.
51. Kiriakopoulos A, Varounis C, Tsakayannis D, Linos D. 2009. Laparoscopic sleeve gastrectomy in morbidly obese patients. Technique and short term results. *Hormones (Athens)* 8: 138-143.
52. Kivela J, Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H. 1999. A low concentration of carbonic anhydrase isoenzyme VI in whole saliva is associated with caries prevalence. *Caries Res*. 33: 178-184.

53. Lasisi TJ, Fasanmade AA. 2012. Salivary flow and composition in diabetic and non-diabetic subjects. *Niger J Physiol Sci.* 27: 79-82.
54. Lamy E, Graça G, da Costa G, Franco C, Capela e Silva F, Sales Baptista E, Coelho AV. 2010. Changes in mouse whole saliva soluble proteome induced by tannin-enriched diet. *Proteome Sci.* 8:65.
55. Lamy E, da Costa G, Santos R, Capela e Silva F, Potes J, Pereira A, Coelho AV, Baptista ES. 2011. Effect of condensed tannin ingestion in sheep and goat parotid saliva proteome. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 95: 304-312.
56. Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, Montmayeur JP, Besnard P. 2005. CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest.* 115: 3177-3184.
57. le Roux CW, Bueter M, Theis N, Werling M, Ashrafian H, Lowenstein C, Athanasiou T, Bloom SR, Spector AC, Olbers T, Lutz TA. 2011. Gastric bypass reduces fat intake and preference. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 301: R1057–R1066.
58. Lee CA, Ismail B, Vickers ZM. 2012. The role of salivary proteins in the mechanism of astringency. *Food Sci.* 77: C381-C387.
59. Lima D, Diniz D, Moimaz S, Sumida D, Okamoto A. 2010. Saliva: reflection of the body. *Int J Infect Dis.* 14:e184–e188.
60. Liu YL, Ford HE, Druce MR, Minnion JS, Field BC, Shillito JC, Baxter J, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR. 2010. Subcutaneous oxyntomodulin analogue administration reduces body weight in lean and obese rodents. *Int J Obes (Lond).* 34: 1715-1725.

61. Looy H, Weingarten HP. 1992. Facial expressions and genetic sensitivity to 6-n-propylthiouracil predict hedonic response to sweet. *Physiol Behav.* 52: 75-82.
62. Lu Y, Bennick A. 1998. Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Arch Oral Biol.* 43: 717-728.
63. Mandel AL, Peyrot des Gachons C, Plank KL, Alarcon S, Breslin PA. 2010. Individual differences in AMY1 gene copy number, salivary  $\alpha$ -amylase levels, and the perception of oral starch. *PLoS One.* 5:e13352.
64. Mata AD, Marques D, Rocha S, Francisco H, Santos C, Mesquita MF, Singh J. 2004. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Mol Cell Biochem.* 261: 137-142.
65. Mathus-Vliegen EM, Nikkel D, Brand HS. 2007. Oral aspects of obesity. *Int Dent J.* 57: 249-256.
66. Matsuo R. 2000. Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity. *Crit Rev Oral Biol Med.* 11: 216-229.
67. Mattes RD. 2011. Accumulating evidence supports a taste component for free fatty acids in humans. *Physiol Behav.* 104: 624–631.
68. Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N, Floriano PN, Simmons G, Bhagwandin B, Jacobson JW, Redding SW, Ebersole JL, McDevitt JT. 2010. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med.* 4: 171–89.
69. Miras AD, Jackson RN, Jackson SN, Goldstone AP, Olbers T, Hackenberg T, Spector AC, le Roux CW. 2012. Gastric bypass surgery for obesity decreases the reward value of a sweet-fat stimulus as assessed in a progressive ratio task. *Am J Clin Nutr.* 96: 467-473.

70. Mod  er T, Blomberg CC, Wondimu B, Julihn A, Marcus C. 2010. Association between obesity, flow rate of whole saliva, and dental caries in adolescents. *Obesity* 18: 2367-2373.
71. Morris C, Fichtel SL, Taylor AJ. 2011. Impact of calcium on salivary  $\alpha$ -amylase activity, starch paste apparent viscosity, and thickness perception. *Chemosens Percept.* 4: 116-122.
72. Murakami H, Sly WS. 1987. Purification and characterization of human salivary carbonic anhydrase. *J Biol Chem.* 262: 1382-1388.
73. Nater UM, Rohleder N. 2009. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology.* 34: 486-496
74. Neyraud E, Sayd T, Morzel M, Dransfield E. 2006. Proteomic analysis of human whole and parotid salivas following stimulation by different tastes. *J Proteome Res.* 5: 2474-2480.
75. Neyraud E, Palicki O, Schwartz C, Nicklaus S, Feron G. 2012. Variability of human saliva composition: possible relationships with fat perception and liking. *Arch Oral Biol.* 57: 556-566.
76. Pannunzio E, Amancio OM, Vitalle MS, Souza DN, Mendes FM, Nicolau J. 2010. Analysis of the stimulated whole saliva in overweight and obese school children. *Rev Assoc Med Bras.* 56: 32-36.
77. Parkkila S, Parkkila AK, Lehtola J, Reinila A, Sodervik HJ, Rannisto M, Rajaniemi H. 1997. Salivary carbonic anhydrase protects gastroesophageal mucosa from acid injury. *Dig Dis Sci.* 42: 1013-1019.

78. Pepino MY, Finkbeiner S, Beauchamp GK, Mennella JA. 2010. Obese women have lower monosodium glutamate taste sensitivity and prefer higher concentrations than do normal-weight women. *Obesity* 18: 959-965.
79. Perry GH, Dominy NJ, Claw KG, Lee AS, Fiegler H, Redon R, Werner J, Villanea FA, Mountain JL, Misra R, Carter NP, Lee C, Stone AC. 2007. Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat Genet.* 39: 1256-1260.
80. Peterli R, Steinert RE, Woelnerhanssen B, Peters T, Christoffel-Courtin C, Gass M, Kern B, von Fluee M, Beglinger C. 2012. Metabolic and hormonal changes after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: a randomized, prospective trial. *Obes Surg.* 22: 740-748.
81. Powers PS, Holland P, Miller C, Powers HP. 1982. Salivation patterns of obese and normal subjects. *Int J Obes.* 6: 267-270.
82. Pournaras DJ, le Roux CW. 2010. Ghrelin and metabolic surgery. *Int J Pept.* pii: 217267.
83. Robinson TM, Gray RW, Yeomans MR, French SJ. 2005. Test-meal palatability alters the effects of intragastric fat but not carbohydrate preloads on intake and rated appetite in healthy volunteers. *Physiol Behav.* 84: 193-203.
84. Sampaio N, Mello S, Alves C. 2011. Dental caries-associated risk factors and type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 17: 152-157.
85. Santos JL, Saus E, Smalley SV, Cataldo LR, Alberti G, Parada J, Gratacòs M, Estivill X. 2012. Copy number polymorphism of the salivary amylase gene: implications in human nutrition research. *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 5: 117-131.

86. Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. 2013. Ghrelin at the interface of obesity and reward. *Vitam Horm.* 91: 285-323.
87. Schipper R, Silletti E, Vingerhoeds M. 2007. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch Oral Biol* 52: 1114-1135.
88. Scruggs DM, Buffington C, Cowan GS Jr. 1994. Taste acuity of the morbidly obese before and after gastric bypass surgery. *Obes Surg.* 4: 24-28.
89. Shigemura N, Miura H, Kusakabe Y, Hino A, Ninomiya Y. 2003. Expression of leptin receptor (Ob-R) isoforms and signal transducers and activators of transcription (STATs) mRNAs in the mouse taste buds. *Arch Histol Cytol.* 66: 253-260.
90. Shimizu K, Kimura F, Akimoto T, Akama T, Otsuki T, Nishijima T, Kuno S, Kono I. 2007. Effects of exercise, age and gender on salivary secretory immunoglobulin A in elderly individuals. *Exerc Immunol Rev.* 13: 55-66.
91. Shin AC, Zheng H, Pistell PJ, Berthoud HR. 2011. Roux-en-Y gastric bypass surgery changes food reward in rats. *Int J Obes (Lond).* 35: 642–651.
92. Shin Y-K, Martin B, Kim W, White CM, Ji S, Sun Y, Smith RG, Sévigny J, Tschöp MH, Maudsley S, Egan JM. 2010. Ghrelin is produced in taste cells and ghrelin receptor null mice show reduced taste responsivity to salty (NaCl) and sour (citric acid) tastants. *PLoS ONE* 5: e12729.
93. Simchen U, Koebnick C, Hoyer S, Issanchou S, Zunft HJ. 2006. Odour and taste sensitivity is associated with body weight and extent of misreporting of body weight. *Eur J Clin Nutr.* 60: 698–705.
94. Sjostrom L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, Dahlgren S, Larsson B, Narbro K, Sjostrom CD, Sullivan M, Wedel H. 2004.

- Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med.* 351: 2683–2693.
95. Spielman AI. 1990. Interaction of saliva and taste. *J Dent Res.* 69: 838-843.
96. Stewart JE, Newman LP, Keast RS. 2011. Oral sensitivity to oleic acid is associated with fat intake and body mass index. *Clin Nutr.* 30: 838-844.
97. Straznicki NE, Lambert EA, Lambert GW, Masuo K, Esler MD, Nestel PJ. 2005. Effects of dietary weight loss on sympathetic activity and cardiac risk factors associated with the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 90: 5998-6005.
98. Szalay C, Aradi M, Schwarcz A, Orsi G, Perlaki G, Németh L, Hanna S, Takács G, Szabó I, Bajnok L, Vereczkei A, Dóczy T, Janszky J, Komoly S, Örs Horváth P, Lénárd L, Karadi Z. 2012. Gustatory perception alterations in obesity: an fMRI study. *Brain Res.* 1473: 131-140.
99. Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA. 1982. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol.* 11: 1-17.
100. Tavares A, Viveiros F, Cidade C, Maciel J. 2011. Cirurgia bariátrica: do passado ao sec XXI. *Acta Med Port.* 24: 111-116.
101. Tepper BJ. 2008. Nutritional implications of genetic taste variation: the role of PROP sensitivity and other taste phenotypes. *Annu Rev Nutr.* 28: 367–388.
102. Tepper BJ, White EA, Koelliker Y, Lanzara C, d'Adamo P, Gasparini P. 2009. Genetic variation in taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil and its relationship to taste perception and food selection. *Ann N Y Acad Sci.* 1170: 126-139.
103. Thatcher BJ, Doherty AE, Orvisky E, Martin BM, Henkin RI. 1998. Gustin from human parotid saliva is carbonic anhydrase VI. *Biochem Biophys Res Commun.* 250: 635-641.



- 104.Tichansky DS, Glatt AR, Madan AK, Harper J, Tokita K, Boughter JD. 2011. Decrease in sweet taste in rats after gastric bypass surgery. *Surg Endosc.* 25: 1176–1181.
- 105.Tremblay M, Brisson D, Gaudet D. 2012. Association between salivary pH and metabolic syndrome in women: a cross-sectional study. *BMC Oral Health.* 12:40.
- 106.Turner RJ, Sugiya H. 2002. Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Dis.* 8: 3-11.
- 107.Vaz M, Jennings G, Turner A, Cox H, Lambert G, Esler M. 1997. Regional sympathetic nervous activity and oxygen consumption in obese normotensive human subjects. *Circulation.* 96: 3423-3429.
- 108.Vitorino R, Lobo MJ, Duarte J, Ferrer-Correia AJ, Tomer KB, Dubin JR, Domingues PM, Amado FM. 2004. In vitro hydroxyapatite adsorbed salivary proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 320: 342-346.
- 109.WHO. 2012. Obesity and overweight. Fact sheet nº311. URL<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
- 110.Williams DL, Hyvarinen N, Lilly N, Kay K, Dossat A, Parise E, Torregrossa AM. 2011. Maintenance on a high-fat diet impairs the anorexic response to glucagon-like-peptide-1 receptor activation. *Physiol Behav.* 103: 557-564.
- 111.Wilson-Perez HE, Chambers AP, Sandoval DA, Stefater MA, Woods SC, Benoit SC, Seeley RJ. 2012. The effect of vertical sleeve gastrectomy on food choice in rats. *Int J Obes (Lond).* 37: 288-295.
- 112.Yang N, Wang C, Xu M, Mao L, Liu L, Sun X. 2005. Interaction of dietary composition and PYY gene expression in diet-induced obesity in rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 25: 243-246.

113. Yeomans MR, Tepper BJ, Rietzschel J, Prescott J. 2007. Human hedonic responses to sweetness: role of taste genetics and anatomy. *Physiol Behav.* 91: 264-273.
114. Yeung DC, Lam KS, Wang Y, Tso AW, Xu A. 2009. Serum zinc-alpha2-glycoprotein correlates with adiposity, triglycerides, and the key components of the metabolic syndrome in Chinese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 94: 2531-2536.
115. Yoshida R, Niki M, Jyotaki M, Sanematsu K, Shigemura N, Ninomiya Y. 2013. Modulation of sweet responses of taste receptor cells. *Semin Cell Dev Biol.* 24: 226-231.
116. Zwirska-Korczala K, Konturek SJ, Sodowski M, Wylezol M, Kuka D, Sowa P, Adamczyk-Sowa M, Kukla M, Berdowska A, Rehfeld JF, Bielanski W, Brzozowski T. 2007. Basal and postprandial plasma levels of PYY, ghrelin, cholecystokinin, gastrin and insulin in women with moderate and morbid obesity and metabolic syndrome. *J Physiol Pharmacol.* 58 Suppl 1: 13-35.

# **Anexos**



## **Anexo I**

### **Consentimento Informado**

**Para o estudo de Avaliação das Alterações do Perfil Proteico Salivar em indivíduos com Obesidade Mórbida nas Fases pré e pós – Cirurgia Bariátrica**

Exma Sra: \_\_\_\_\_

Gostariamos de obter a sua autorização para a colheita de cerca de 2ml de saliva, na qual se pretende dosear proteínas.

Estes doseamentos destinam-se a relacionar com o comportamento alimentar.

Este estudo é importante para nós, pois pretendemos utilizar este método num projecto de investigação que será realizado com outros voluntários.

Os resultados são anónimos e serão utilizados apenas para investigação.

Por favor, coloque quaisquer dúvidas que tenha.

Isabel do Carmo  
Directora do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Santa Maria

Autorizo

Não autorizo

Data \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

Cartão do Cidadão( Bilhete de identidade) número \_\_\_\_\_



## Anexo II

### *Questionário de Recolha*

Local de recolha: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/2011 Hora: \_\_\_\_\_

Variáveis	
Sexo	
Idade (anos)	
Peso (Kg)	
Altura (m)	
IMC	
Perímetro abdominal	
Hábitos tabagistas	
Consumo de cafeína (frequência)	
Consumo de bebidas alcoólicas (frequência)	
Última refeição (horas)	
Consumo de fármacos	
Doenças	

ID da amostra de saliva: \_\_\_\_\_





### Anexo III

#### Determinação dos pontos isoelectricos dos spots proteicos observados em géis 2-DE para tiras (IPG strips) de 13 cm, gama de pH 3-10 não linear

O ponto isoelectrico aparente de cada spot foi determinado através da medição do comprimento da tira e da posição da tira no gel de segunda dimensão, tendo em conta a largura deste. Seguidamente, através da posição de cada spot (como percentage da largura do gel) foi feita interpolação gráfica (Fig. 1).

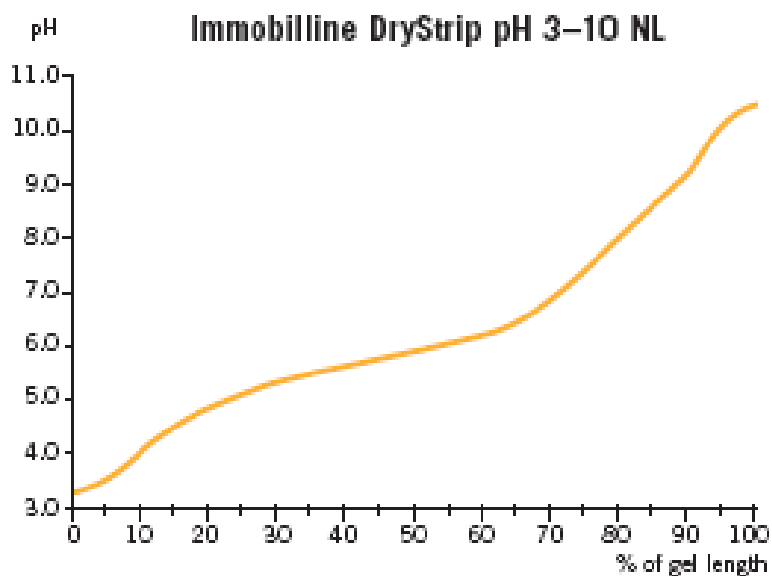


Fig. 1 – Gráfico de gradient de pH. O gradiente de pH apresentado nesta figura é válido para condições próximas de 20°C em 8M ureia, usando IPGbuffer 3-10 NL. (Immobiline DryStrip gels Data file, 18-1177-60 AB, 2004-06; GE-Healthcare).



## Anexo IV

### Análise individual das membranas obtidas por imunomarcção com anticorpo primário anti-anidrase carbónica VI.

Membrana 1			Membrana 2		
<i>NP</i>	<i>OCC</i>	<i>OSC</i>	<i>NP</i>	<i>OCC</i>	<i>OSC</i>
601,4	283,7	1099,2	832,4	486,1	615,0
Membrana 3			Membrana 4		
<i>NP</i>	<i>OCC</i>	<i>OSC</i>	<i>NP</i>	<i>OCC</i>	<i>OSC</i>
1232,5	387,9	1099,2	872,7	617,3	893,9

Os valores numéricos correspondem aos volumes ajustados de cada uma das bandas marcadas com anticorpo anti-anidrase carbónica VI (obtidos através de análise com o software Quantity-One, Bio-Rad) (média de cada grupo para cada uma das membranas individuais). NP – indivíduos normoponderais; OCC – indivíduos obesos submetidos a cirurgia bariátrica; OSC – indivíduos obesos não submetidos a cirurgia bariátrica.

